UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de diferentes estrategias de control de *Meloidogyne* sp. en cultivos de interés agronómico

Erika Pamela Fernández Calle

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Medellín, Colombia
2018

Evaluación de diferentes estrategias de control de *Meloidogyne* sp. en cultivos de interés agronómico

Erika Pamela Fernández Calle

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias - Biotecnología

Directora:
Ph.D Valeska Villegas Escobar
Grupo de Investigación: CIBIOP
Universidad EAFIT

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Medellín, Colombia
2018

La ciencia más que un conjunto de conocimientos, es una forma de pensar.

Carl Sagan

Agradecimientos

La ejecución de esta investigación fue gracias a los aportes del Sistema General de Regalías, en el marco del proyecto *Investigación técnico-social de las oleaginosas promisorias higuerilla y Sacha inchi con miras a su desarrollo agroindustrial* y se realizó bajo el contrato de acceso a recursos genéticos 166 suscrito entre el ministerio de medio ambiente, EAFIT y Augura. Agradecimientos especiales a los integrantes del grupo de investigación CIBIOP de la Universidad EAFIT, a todo el personal técnico y administrativo de los laboratorios y a aquellos que sin querer, entendieron un poco del proceso científico.

Especialmente agradezco a Valeska Villegas Escobar por su dedicación, acompañamiento y paciencia.

Finalmente a mis amigos y familia, compañeros de este proceso que no acaba.

Resumen

Meloidogyne incognita es un nematodo capaz de afectar cultivos de importancia agronómica, entre los que se encuentran tomate y Sacha inchi. El control de este nematodo tiene importancia debido a que ocasiona pérdidas importantes en estos cultivos. Es por esto que la evaluación de diferentes estrategias de control se hace necesaria, para lo cual el objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad de diferentes productos nematicidas registrados y extractos bacterianos en el control de *M. incognita in vitro* e *in vivo*. Los nematicidas Rugby®, Verango®, Safersoil®, Safelomyces®, QL Agri® y Sincocin® tuvieron efecto en la disminución de la eclosión de huevos y movilidad de juveniles J2 de *M. incognita* a nivel *in vitro*, así como los sobrenadantes libres de células (SLC) de 9 especies de *Bacillus* evaluadas, con porcentajes de reducción por encima del 60%. De estos, *B. pumilus* EA-CB0070, *B. amyloliquefaciens* EA-CB1329 y *PaeniBacillus* sp. EA-CB0305, tuvieron en promedio reducciones en las nodulaciones en tomate del 90%, seguidos de los tratamientos con *B. gibsonii* EA-CB0579, *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. subtilis* EA-CB0575 donde se encontraron en promedio un 62% menos de nodulaciones. La actividad nematicida de los SLC de estas últimas tres cepas, permaneció estable a cambios de temperatura (50 – 100 °C), acción enzimática (proteinasa K) y a tratamiento a pH 2, caso contrario al ser tratados a pH 10, en donde la actividad nematicida disminuyó para los SLC de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. pumilus* EA-CB0070, aunque no para *B. gibsonii* EA-CB0579. Adicionalmente, se separaron mediante RP-HPLC los lipopéptidos iturinas, fengicinas y surfactinas producidas por la cepa *B. subtilis* EA-CB0015. Estos se evaluaron de forma individual frente a la eclosión de huevos de *M. incognita* y todos tuvieron efecto en la disminución de la eclosión de este estadio. Estos resultados permiten aportar información en el control de este nematodo fitopatógeno mediante diferentes estrategias, así como los posibles metabolitos contra *M. incognita* producidos por *B. subtilis*.

Palabras clave: *M. incognita*, tomate, Sacha inchi, *Bacillus* spp., lipopéptidos**.**

Abstract

Meloidogyne incognita is a nematode that infect many crops of agronomic importance, including tomato and Sacha inchi. Controlling this nematode is highly relevant because it causes important crop loses, and therefore evaluating different control strategies are needed. The aim of this work was to evaluate the effectiveness of different nematicidal products and bacterial extracts in the control of *M. incognita in vitro* and *in vivo*. Nematicides Rugby®, Verango®, Safersoil®, Safelomyces®, QL Agri® and Sincocin® had effect on the decrease in hatching of eggs and movility of J2 juveniles of *M. incognita*, as well as cell free supernatants (CFS) of 9 species of *Bacillus* evaluated, with percentage of inhibition above 60%. From these bacteria, *B. pumilus* EA-CB0070, *B. amyloliquefaciens* EA-CB1329 and *PaeniBacillus* sp. EA-CB0305, had reductions on nodulations in tomato on average by 90%, followed by the treatments with *B. gibsonii* EA-CB0579, *B. subtilis* EA-CB0015 and *B. subtilis* EA-CB0575, with 62% less nodulations. The nematicidal activity for the last three CFS, was retained during exposure to temperature changes (50 – 100 °C), enzymatic activity (proteinase K) and pH 2 treatment, opposite results were found in pH 10 treatment, were nematicidal activity decreased for strains *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. pumilus* EA-CB0070. Additionally, were separated lipopeptides fengycins, iturins and surfactins by RP-HPLC produced by *B. subtilis* EA-CB0015. Those lipopeptides were evaluated individually and all suppressed hatching of eggs. All the results allow contribute information about the control of this phytopathogen nematode by means of different strategies, as well as possible metabolites produced by *B. subtilis* involved against *M. incognita*.

Keywords: *M. incognita*, tomato, Sacha inchi, *Bacillus* spp., lipopeptides.

Contenido

Pág.

Resumen y Abstract ….…….... - V -

Lista de figuras …….. - X -

Lista de tablas …… - XI -

Lista de ecuaciones ……. - XII -

Lista de abreviaturas …… - XIII -

Introducción……... - 1-

Objetivos ……... - 4 -

1. Marco teórico ..... - 18 -

1.1 Nematodos fitopatógenos: *Meloidogyne* spp. ..... - 18 -

1.1.1 Ciclo de vida *Meloidogyne* spp. ..... - 19 -

1.1.2 Sintomatología de la enfermedad ..... - 20 -

1.2 Incidencia de *Meloidogyne* spp. en plantas de interés agrícola ..... - 21 -

1.2.1 Tomate ..... - 21 -

1.2.2 Sacha inchi ..... - 22 -

1.3 Control de *Meloidogyne* spp. ..... - 23 -

1.3.1 Productos químicos ..... - 23 -

1.3.2 Productos naturales ..... - 25 -

1.4 *Bacillus* spp. y sus moléculas nematicidas ..... - 27 -

1.4.1 Enzimas ..... - 28 -

1.4.2 Lipopéptidos ..... - 28 -

2. **Materiales y métodos** ..... - 30 -

2.1 Nematodo *Meloidogyne* sp. ..... - 30 -

2.1.1 Aislamiento y mantenimiento ..... - 30 -
2.1.2 Identificación de *Meloidogyne* sp. ..... - 31 -
2.1.3 Obtención de huevos y juveniles J2 de *Meloidogyne* sp. ..... - 31 -
2.2 Productos nematicidas ..... - 32 -
2.3 Microorganismos bacterianos ..... - 34 -
2.3.1 Almacenamiento e identificación ..... - 34 -
2.3.2 Obtención de SLC y sobrenadantes bacterianos ..... - 34 -
2.4 Evaluaciones *in vitro* ..... - 35 -
2.5 Evaluaciones a nivel de invernadero ..... - 36 -
2.5.1 Ensayo con nematicidas ..... - 36 -
2.5.2 Evaluación con sobrenadantes bacterianos ..... - 37 -
2.5.3 Determinación de variables de crecimiento y de enfermedad ..... - 38 -
2.6 Caracterización fisicoquímica de los SLC ..... - 38 -
2.6.1 pH ..... - 38 -
2.6.2 Temperatura ..... - 39 -
2.6.3 Proteinasa K ..... - 39 -
2.7 Purificación de compuestos activos contra *Meloidogyne* sp. ..... - 40 -
2.7.1 Separación en fase sólida SPE ..... - 40 -
2.7.2 Purificación por RP-HPLC ..... - 40 -
2.7.3 Prueba *in vitro* ..... - 41 -
2.8 Diseño experimental y análisis estadístico ..... - 42 -
3. Resultados ..... - 43 -
3.1 Caracterización e identificación de los aislamientos de *Meloidogyne* sp. ..... - 43 -
3.2 Selección de nematicidas y SLC a nivel in vitro ..... - 45 -
3.2.1 Nematicidas comerciales ..... - 45 -
3.2.2 SLC tienen efecto nematicida sobre *M. incognita* ..... - 48 -
3.3 Selección de agentes controladores de *M. incognita* en invernadero ..... - 50 -
3.3.1 Nematicidas comerciales ..... - 50 -
3.3.2 Sobrenadantes bacterianos ..... - 54 -
3.4 Caracterización fisicoquímica de los SLC ..... - 56 -
3.5 Prueba *in vitro* con fracciones SPE ..... - 59 -

3.6 Efecto de diferentes lipopéptidos de *B. subtilis* EA-CB0015 en la eclosión de huevos de *M. incognita*..... - 60 -

4. Discusión ..... - 63 -

5. Conclusiones y recomendaciones ..... - 73 -

A. Anexo 1 ……... -64-

B. Anexo 2 ……... - 65 -

6. Bibliografía..... - 79 -

Lista de Figuras

Pág.

Figura 3-1: Muestras colectadas del sistema radicular de un cultivo de Sacha inchi provenientes de la Finca Agroindustrias Amazónicas (Fredonia, Colombia) para el aislamiento de *Meloidogyne* spp. .....- 43 -
Figura 3-2: Sintomatología causada por *Meloidogyne* sp. en plantas de tomate y de sacha inchi; a) Nodulaciones radiculares en tomate (*Solanum lycopersicum* var. Santa Clara) 25 d después de siembra. .....- 44 -
Figura 3-3: Comparación de patrones perineales de hembra de *Meloidogyne* sp. aislada de tomate .....- 44 -
Figura 3-4: Efecto de diferentes productos nematicidas comerciales sobre la eclosión de huevos de *M. incognita* a nivel *in vitro*. .....- 46 -
Figura 3-5: Efecto de diferentes productos nematicidas comerciales sobre la movilidad de estadios juveniles J2 de *M. incognita* a nivel *in vitro* .....- 47 -
Figura 3-6: Efecto de los SLC bacterianos sobre la eclosión de huevos de *M. incognita* a nivel *in vitro* .....- 49 -
Figura 3-7: Efecto de los SLC bacterianos sobre la movilidad de juveniles J2 de *M. incognita* a nivel *in vitro*. .....- 50 -
Figura 3-8: Efecto de las fracciones recuperadas mediante SPE de SLC de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. gibsonii* EA-CB0579 en la actividad nematicida sobre huevos de *M. incognita*. .....- 60 -

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2-1: Productos nematicidas de origen químico, vegetal y biológico seleccionados para las evaluaciones *in vitro* y en invernadero. 20

Tabla 2-2: Origen y caracterización de cepas de *Bacillus* spp..... 21

Tabla 3-1: Efecto de productos nematicidas sobre la severidad de *M. incognita* en tomate aplicando la dosis recomendada por la casa comercial. 39

Tabla 3-2: Efecto de productos nematicidas sobre la severidad de *M. incognita* en tomate aplicando el doble de la dosis recomendada por la casa comercial. 40

Tabla 3-3: Efecto de sobrenadantes bacterianos en la severidad causada por *M. incognita* en tomate a nivel de invernadero 42

Tabla 3-4: Efecto de la temperatura en la actividad nematicida de los SLC sobre la eclosión de huevos de *M. incognita*..... 44

Tabla 3-5: Efecto del pH en la actividad nematicida de los SLC sobre la eclosión de huevos de *M. incognita*..... 45

Tabla 3-6: Efecto de la proteinasa K en la actividad nematicida de los SLC sobre la eclosión de huevos de *M. incognita*……...46

Tabla 3-7: Efecto de los lipopéptidos de *B. subtilis* EA-CB0015 en la eclosión de huevos de *M. incognita* a nivel *in vitro*. 48

Lista de ecuaciones

Pág.

(2-1) 23
(2-2) 23

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
A-ChE	Acetilcolinestareasa
DDI	Días después de inoculación
Fen	Fengicinas
Itu	Iturinas
MetOh	Metanol
ppm	Partes por millón
SLC	Sobrenadante libre de células
Sur	Surfactinas
TFA	Ácido trifluoroacético

Introducción

Las diversas especies de *Meloidogyne* son consideradas de importancia dentro de los nematodos fitopatógenos, ya que causan enfermedad en una gran variedad de cultivos distribuidos a nivel mundial (Siddiqui y Shahid Shaukat, 2003). Estos nematodos fitopatógenos son parásitos obligados de las raíces en donde se establecen y se reproducen causando daños irreparables en las plantas (Radwan, Farrag, Abu-Elamayem, & Ahmed, 2012a). Se estima que hay pérdidas de aproximadamente de 12% en el rendimiento de cultivos a nivel mundial en cultivos de flores, hortalizas y vegetales (Singh, Singh, & Singh, 2015).

Dentro de los cultivos de importancia agronómica se encuentra el tomate, un vegetal que se consume y produce a nivel mundial y que posee un alto contenido de micronutrientes, vitaminas y antioxidantes (Arias et al., 2009). No obstante, este cultivo es afectado por una diversidad de plagas y patógenos entre ellos *Meloydogyne* spp., los cuales pueden generar una reducción en el rendimiento de la producción de hasta un 68% (Antón & Guzmán-Hernández, 2013). Por otro lado está Sacha inchi, es una planta oleaginosa distribuida en Latinoamérica en países como Colombia, Perú y Bolivia (Cai, Zhang, y Jian, 2013) y que presenta altos contenidos de aceites esenciales (40 - 60%) y proteína (27 - 30%) (Cai, 2011). La producción de Sacha inchi en Colombia ha incrementado en un 900% entre los años 2009 y 2016, ya que en zonas como Putumayo, Amazonas y Valle del Cauca, se produjeron 41 ton de semilla en el 2009 y para el 2016, aumentó a 440 ton (Agronet, 2018). De la misma manera que para tomate, *Meloidogyne* spp. representa uno de los mayores problemas de manejo fitosanitario, con pérdidas del cultivo de aproximadamente el 90% (Álvarez y Rios, 2007). Hasta el momento, se han desarrollado estudios sobre esta problemática en Sacha inchi enfocados en el diagnóstico de la susceptibilidad y resistencia de diferentes accesiones de Sacha inchi al ataque por nematodos fitopatógenos (Castro

Sánchez, 2013; Márquez Dávila, Gonzalez, Arévalo, & Solis, 2013), así como el control de este nematodo a partir de la utilización bajo condiciones de invernadero de hongos nematófagos (Leiva Piedra, 2009), sin tener la evaluación de varias estrategias de control, llevando a que sea un campo de gran importancia para encontrar alternativas de manejo para este cultivo.

Algunos de los síntomas que genera *Meloidogyne* spp., se encuentran la formación de nódulos, deficiencia de crecimiento y clorosis, causando el deterioro de la planta y posterior muerte (Arias et al., 2009). Para evitar lo anterior, el manejo agronómico de esta plaga en diversos cultivos a nivel mundial se enmarca en la rotación de cultivos, siembra de variedades resistentes y aplicación de nematicidas de origen tanto químicos como extractos vegetales y biológicos (Timper, 2014; Xiong et al., 2015). En Colombia, se encuentran registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario-ICA y para plantas de importancia económica a nivel nacional, productos destinados al control de nematodos del género *Meloidogyne* tales como Rugby®, Safersoil®, Safelomyces®, Sincocin® y Eco AZ® (Instituto Colombiano Agropecuario-ICA, 2014a, 2014b). No obstante, para el cultivo de Sacha inchi no existen productos nematicidas registrados y por lo tanto, no se cuenta con información que determine la efectividad de estos productos para el control de *Meloidogyne* spp. en esta planta oleaginosa.

Dentro del grupo de nematicidas biológicos, se han reportado diferentes organismos que tienen potencial frente al control de *Meloidogyne* spp., mediante la inhibición de la eclosión, la movilidad o la infección en diferentes plantas (Lamovšek, Urek, & Trdan, 2013). El género *Bacillus* spp. es uno de ellos, en el cual se ha determinado la habilidad de inhibir el crecimiento del fitopatógeno y la inducción resistencia en la planta, mediante la producción de enzimas y lipopéptidos que interactúan directamente con el fitonematodo o con la planta (Lee & Kim, 2015). Sin embargo, existen cepas nativas de las cuales se desconoce su posible potencial frente al control de *Meloidogyne* spp.

El objetivo de esta investigación fue determinar el potencial de diversos productos nematicidas registrados en Colombia y los productos de fermentación o extractos bacterianos de *Bacillus* spp. sobre *M. incognita*. Específicamente, se determinó el efecto

de estos productos y extractos bacterianos tanto a nivel *in vitro* sobre diversos estadios del nematodo y a nivel de invernadero sobre *Solanum lycopersicum* var. Santa Clara.

Adicionalmente, se realizaron caracterizaciones de los sobrenadantes libres de células (SLC) de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015, *B. pumilus* EA-CB0070 y *B. gibsonii* EA-CB0579 los cuales tuvieron efecto en la actividad nematicida en las pruebas *in vitro* y en invernadero, con el fin de esclarecer las posibles moléculas involucradas en la actividad nematicida de *Bacillus* spp. Estas evaluaciones permitieron seleccionar productos potenciales para el manejo agronómico de *M. incognita* en tomate bajo condiciones de invernadero y determinar los posibles componentes de los productos de fermentación efectivos en el control del nematodo fitopatógeno.

Objetivo general

Evaluar la efectividad de diferentes productos registrados y extractos bacterianos en el control de nematodos fitopatógenos del género *Meloidogyne* en plantas de interés agrícola.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de diferentes productos nematicidas y sobrenadantes bacterianos libres de células sobre estadios huevos y juveniles J2 de *Meloidogyne* sp., a nivel *in vitro*.
2. Evaluar los productos nematicidas que tuvieron mejor desempeño *in vitro* así como los sobrenadantes bacterianos, en la reducción de las afectaciones causadas por *Meloidogyne* sp. en plantas de sacha inchi y tomate *Solanum lycopersicum* var. Santa Clara, a nivel de invernadero.
3. Caracterizar fisicoquímicamente tres sobrenadantes bacterianos libres de células que tuvieron un buen desempeño en las pruebas *in vitro* y en invernadero.
4. Determinar las posibles moléculas involucradas en la actividad nematicida de *Bacillus subtilis* EA-CB0015.

1. Marco teórico

1.1 Nematodos fitopatógenos: *Meloidogyne* spp.

Dentro de los nematodos fitopatógenos se encuentra un amplio grupo de géneros capaces de desarrollarse dentro y fuera de la planta, considerados como especies invasivas gracias a que se establecen, multiplican y causan un efecto negativo en el área en el que se encuentran (Singh et al., 2013). Estos organismos son de interés agronómico, debido a que causan pérdidas aproximadamente del 12 % en el rendimiento de cultivos a nivel mundial, cifra equivalente a $157 millones de dólares de la producción agrícola (Singh et al., 2015). De estas pérdidas, *Meloidogyne* spp. representa uno de los principales géneros de nematodos fitopatógenos, capaces de parasitar alrededor de 1700 especies de plantas de importancia económica en las que puede establecerse, sobre todo en los trópicos (Bebber, Holmes, & Gurr, 2014; Zhang et al., 2012), debido a que las condiciones ambientales de humedad y temperatura en esta zona, propician la infección. Se conocen alrededor de 98 especies pertenecientes al género *Meloidogyne* capaces de parasitar variedad de plantas vasculares, de las cuales se consideran las más representativas *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. hapla* y *M. incognita* (Jones et al., 2013).

Algunos autores categorizan a *Meloidogyne* spp. como especies invasivas, debido a que posee múltiples rutas de entrada a los cultivos en donde se establece, altas tasas de reproducción, diversidad de hospederos, ciclo de vida corto y habilidad para sobrepasar la resistencia de la planta hospedera (Bebber et al., 2014; S. Singh et al., 2013). *Meloidogyne* spp. también es conocido como el nematodo agallador, se ha considerado un organismo de gran interés, debido a que puede ser imperceptible para la planta. Al infectar, inyecta a la célula proteínas efectoras que suprime los genes de defensa de las plantas y terminan siendo imperceptibles para el hospedero (Bellafiore & Briggs, 2010).

1.1.1 Ciclo de vida *Meloidogyne* spp.

Las especies de este género de nematodos fitopatógenos, tienen un comportamiento biótrofo y su ciclo de vida se centra en estadios huevos, cuatro estadios juveniles, hembras y machos adultos (Rohini, Ekanayake, & Vito, 1986).

Los huevos al ser depositados, están contenidos en una matriz de glicoproteínas, las cuales se encuentran usualmente en la superficie de los nódulos en las raíces (Perry & Moens, 2006). Al eclosionar, las larvas de *Meloidogyne* spp. pasan a juveniles J1 y luego a juveniles J2, los cuales se mueven libremente en el suelo rizosférico, en busca de la punta de la raíz para ingresar a la planta y desarrollar sitios de alimentación; después de establecerse, se convierten en sedentarios, pasan a los estadios juveniles J3 y J4 y posteriormente se diferencian en hembras o machos (Perry, Moens, & Starr, 2009; Subramanian et al., 2017).

Las hembras, los machos y los juveniles de *Meloidogyne* spp., poseen estiletes que consisten en una punta cónica, un tubo recto y tres glándulas (Perry et al., 2009), estructuras que les permiten perforar, ingresar y alimentarse. Las glándulas esofágicas, están encargadas de la secreción de proteínas y metabolitos envueltos en la reprogramación del desarrollo celular radical, suprimiendo genes comprometidos en la defensa de la planta (Stéphane Bellafiore et al., 2008).

Al perforar la raíz e ingresar, los juveniles J2 insertan su estilete en el citoplasma de las células vegetales, induciendo mediante la inyección de proteínas efectoras que causan división de núcleo celular sin citocinesis, dando lugar a células gigantes que nutren al nematodo, principal característica del género *Meloidogyne* (Stephane Bellafiore & Briggs, 2010; Curtis, 2007); éstas se convierten en estructuras complejas de alimentación en las raíces de los hospederos, propiciando una fuente duradera y rica en nutrientes (Jones et al., 2013). Luego de que se establecen las condiciones apropiadas de alimentación y las hembras se establecen en el sitio de alimentación, producen las masas de huevos de las cuales emergen los juveniles J2 y comienza de nuevo el ciclo de vida del nematodo.

Algunas condiciones del trópico, son favorables para que este nematodo tenga ciclos de vida cortos, teniendo varias generaciones por estaciones y favoreciendo el establecimiento rápido de las poblaciones (Coyne, Nicol, & Claudius-Cole, 2007). El desarrollo y la duración del ciclo de vida de *Meloidogyne* spp., depende de factores ambientales y del hospedero, debido a que al tener condiciones óptimas de temperatura y humedad por ejemplo, este nematodo fitopatógeno podría desarrollar un ciclo de vida más corto y generar más poblaciones en el suelo (Rohini et al., 1986) o de forma contraria, no completarse el ciclo de vida (Ploeg & Maris, 1999) . Ploeg y Maris (1999), reportaron que en plantas de tomate *M. incognita* a 19.5 y 25 °C tarda 44 y 27 d en completar el ciclo de vida, respetivamente.
En este sentido, conocer el ciclo de vida de *Meloidogyne* spp., los tiempos y las condiciones de propagación es importante a la hora de seleccionar los estadios en los cuales se desea realizar intervención, con el fin de un adecuado manejo fitosanitario del nematodo (Jansen-Girgan, Claassens, & Fourie, 2016).

1.1.2 Sintomatología de la enfermedad

La aparición de los síntomas varía desde la especie del nematodo, el género de la planta y las condiciones de cultivo (Ravichandra, 2014). Pero en la mayoría de las plantas aparecen síntomas de deficiencia nutricional, teniendo como consecuencia la disminución en los rendimientos, dependiendo de la densidad poblacional en el suelo (Arias et al., 2009).

Es común que la manifestación de la enfermedad se dé con hojas cloróticas o amarillas, disminución en el tamaño de la raíz, enanismo de la planta, marchitez y reducción en la longitud de las raíces, causando deficiencia en la captación de nutrientes para el crecimiento de la planta (Coyne et al., 2007). La aparición de estos síntomas va a depender del desarrollo del nematodo. En este sentido, se establece que a 25°C el ciclo
de vida en tomate dura aproximadamente 27 d, tiempo para el cual ya se podrían observar nodulaciones y acortamiento en raíces, disminución en el crecimiento y posteriormente, marchitez (Perry & Moens, 2006).

Uno de los principales signos causados por *Meloidogyne* spp. es la formación de nódulos en las raíces de las plantas (Álvarez & Rios, 2007), aunque en algunos hospederos como

papa y zanahoria, deforman como tal el tubérculo y hacen que el signo de la enfermedad no sea detectable a simple vista, sobre todo cuando las hembras no depositan las masas de huevos por fuera de la raíz sino embebidas en la corteza de las mismas (Perry et al., 2009; Jones et al., 2013). Estas nodulaciones, sirven como herramienta para conocer la severidad de la infección causada por el nematodo en la planta.

En el caso de tomate, esta planta al estar infectada por este nematodo, muestra retraso en el crecimiento y los síntomas típicos generados por *Meloidogyne* spp. (Z. A. Siddiqui, 2004), siendo una de las plantas modelo más estudiada en cuanto a la interacción nematodo-hospedero (Seid, Fininsa, Mekete, Decraemer, & Wesemael, 2015).

1.2 Incidencia de *Meloidogyne* spp. en plantas de interés agrícola

1.2.1 Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*), es una planta de la familia de las solanáceas, nativa del sur y el centro de América, la cual ha sido importante debido a que es una fuente rica en micronutrientes, vitaminas y antioxidantes y hace parte de la dieta humana (Arias et al., 2009; Seid et al., 2015). El crecimiento de esta planta se puede desarrollar en muchos tipos de suelo, aunque estos deben ser ricos en materia orgánica con un rango de pH óptimo entre 6 - 7 (Udo, Uguru, & Ogbuji, 2013). Esta es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual, puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta; el ciclo de producción es de aproximadamente 7 meses a 25°C. La humedad relativa ideal para el desarrollo del cultivo de tomate debe estar entre un 65 y un 75% para su óptimo crecimiento y fertilidad (Escobar & Lee, 2009; Jaramillo, Rodríguez, Guzmán, Zapata C., & Rengifo, 2007).

A nivel mundial, existen 5 x 10^6 ha de producción, en las cuales para el 2016 se reportaron 170.000.000 ton producidas globalmente, de las cuales los países americanos aportan el 18.5% (FAO, 2018). Colombia ocupa el puesto número 34 a nivel mundial en la producción

y el departamento del país que encabeza la lista en área cosechada de tomate es Norte de Santander con aproximadamente 2000 ha, seguido de Santander y Boyacá (Agronet, 2018). Sin embargo, existen diversas enfermedades que atacan a esta planta y su fruto, afectando así la calidad y generando disminución en el rendimiento de la producción de tomate. Una de las afectaciones asociadas a éstas pérdidas es el ataque por nematodos, de los cuales uno de los géneros de mayor importancia es *Meloidogyne* spp., del cual se ha reportado que puede generar una reducción en el rendimiento de la producción de hasta un 68% (Antón & Guzmán- Hernández, 2013).

Hasta el momento, el control de esta plaga en cultivos susceptibles de tomate está asociado a diferentes estrategias químicas, biológicas y culturales, dentro de planes de manejo integrado de plagas y enfermedades. Es así como se reporta el uso de formulaciones a partir de microorganismos como *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp. y *Purpureocilium lilacinus* (Radwan et al., 2012a; Terefe, Tefera, & Sakhuja, 2009), así como la utilización de compuestos químicos y extractos vegetales (Nasr, 2015; Oka et al., 2000).

1.2.2 Sacha inchi

Plukenetia volubilis comúnmente conocida como Sacha inchi hace parte de la familia Euphorbiaceae, con distribución en regiones tropicales, (Cardinal-McTeague & Gillespie, 2016). Es una planta que ha cobrado relevancia debido a que los contenidos de aceites Omega-3 y -6 y proteicos en sus semillas, propiedad que ayudó a que sean tradicionalmente consumidas por diferentes grupos nativos de la región amazónica (Guillén, Ruiz, Cabo, Chirinos, & Pascual, 2003; Gutiérrez, Rosada, & Jiménez, 2011).
Los principales productores de Sacha inchi a nivel mundial son Perú y Ecuador y otros países como China, en donde hay cultivos emergentes de esta oleaginosa (Yang et al., 2017).

En Colombia, los cultivos de Sacha inchi se han reportado hasta el año 2016 en los departamentos de Putumayo, siendo el mayor productor con 184 ha de área cosechada, seguida de Valle del Cauca con 87 ha, Amazonas 60 ha y Antioquia 57 ha (Agronet, 2018). Las semillas de Sacha inchi que se encuentran son nativas, originarias de la región amazónica del país. Dentro de los estudios a nivel nacional, las semillas que se han

utilizado han sido materiales distribuidos comercialmente por la empresa Colbio (Ayala Martínez, 2016), denominados INCA-1, CATIO-2 y NUKAK-3.

Dentro de las principales plagas y enfermedades que atacan esta planta, se encuentran especies de los nematodos *Aphelenchus* y *Meloidogyne*, siendo este último el principal agente causal de mortandad en el cultivo alrededor del segundo año de producción, con mortalidad de alrededor del 90% por plantación (Álvarez & Rios, 2007; Manco-Céspedes, 2006). En China, se reporta *M. javanica* en plantas cultivadas de Sacha inchi (Wang et al., 2014); las hembras aisladas en esta región, son de coloración rojiza y con producción de masas de huevos internas. Del mismo modo, en Perú se han desarrollado investigaciones que han apuntado a evaluar las concentraciones infectivas de *Meloidogyne* sp. en diferentes variedades de Sacha inchi (Márquez Dávila et al., 2013; Márquez, Cayotopa, Arévalo, Vivanco, & Arévalo, 2007), así como estrategias de control del nematodo mediante la utilización de hongos nematófagos (Leiva Piedra, 2009).

1.3 Control de *Meloidogyne* spp.

El manejo agronómico de esta enfermedad, históricamente se ha hecho por la introducción de plantas resistentes, rotación de cultivos, prácticas culturales o nematicidas químicos (Ortiz, Perry, Goovaerts, Vellidis, y Sullivan, 2010). El manejo integrado de estos organismos fitoparásitos, se hace de manera conjunta utilizando métodos de control cultural, químico, microbiológico y alternativas como el uso de productos naturales como extractos vegetales (Lamovšek et al., 2013).

1.3.1 Productos químicos

La utilización de agentes de control de nematodos, se ve enmarcada en la implementación de agentes químicos o pesticidas, los cuales muestran resultados rápidos mediante acción por contacto y/o vía sistémica. Pueden ser aplicados en semilla, haciendo inmersión de la raíz de la planta o mediante aplicación directa en suelo (Rahman Khan, Haque, & Nida, 2014). Estos agentes han sido los más utilizados y efectivos a la hora de reducir las

poblaciones de *Meloidogyne* spp., promoviendo que la industria de pesticidas se interese en la producción de nematicidas de nueva generación o menos perjudiciales en el ecosistema (Seid et al., 2015).

Los organofosfatos son moléculas que se han encontrado efectivas en el control de *Meloidogyne* spp.; dependiendo de la concentración y del modo de aplicación, su efecto puede variar, pero la forma de acción es mediante la inhibición de la actividad en la acetil-colinestareasa (A-ChE) (Aktar, Sengupta, & Chowdhury, 2009; Gonçalves Borges, Kuhn Odair, Battistus, Lopez Estevez, & Coltro, 2013), la cual está implicada en la señalización del sistema nervioso del nematodo, dejando como consecuencias parálisis del mismo (Radwan, Farrag, Abu-Elamayem, & Ahmed, 2012b) ; dentro de este grupo se encuentran por ejemplo, los cadusafos, fosfiazatos, fenamifos y terbufos, moléculas activas de productos nematicidas que son distribuidos en Colombia (Instituto Colombiano Agropecuario-ICA, 2017b). Estas moléculas también están presentes en productos de distribución internacional, como Nemathorin® (Syngenta), Vydate® (Dupont) y Aeris® (Bayer Cropscience), comercializado en EEUU y que guarda similitud en sus ingredientes activos con Larvin®, el cual tiene distribución en Colombia.

Por otro lado, algunas moléculas fungicidas se han reportado como nematicidas y se han comercializado para el control de *M. incognita* y *Rotylenchulus reniformis*. Es el caso de la molécula Fluopyram presente en nematicidas de circulación en Colombia e inhibidor de la enzima succinato deshidrogenasa, la cual está implicada en la respiración celular del microorganismo (Faske & Hurd, 2015).

La implementación de éstas moléculas como plaguicidas, ha contribuído al desarrollo de la agricultura mediante el control de plagas y enfermedades. Los pesticidas deben ser letales para las especies objeto de control y no para otras e infortunadamente este no es el caso (Aktar et al., 2009); esto, sumado a las regulaciones de los agentes de control químico, debido a las implicaciones ambientales y en la salud humana, ha sido un tema controversial a la hora de hacer uso de estos agentes.

1.3.2 Productos naturales

- **Extractos vegetales**

Los aceites esenciales vegetales, pueden ser sustancias volátiles encontradas en variedad de plantas; entre ellos se encuentran algunos terpenoides y fenoles que han exhibido actividad nematicida (Andrés et al., 2012). Dentro del grupo de extractos vegetales que se reportan como potenciales controladores de nematodos fitopatógenos, entre ellos *Meloidogyne* spp., está la jojoba, caléndula y neem (Mervat, Shawky, & Shaker, 2012; Oka et al., 2000), los cuales son tenidos en cuenta como alternativas de manejo de este parásito. Los modos de acción de estos compuestos están muy relacionados con la capacidad de inhibir el sistema nervioso, interferir con el neuromodulador octopamina o permeabilización de la membrana celular (Andrés et al., 2012). Del mismo modo, pueden modificar y potenciar las poblaciones presentes en el suelo que pueden llegar a ser antagonistas de los nematodos parásitos de la planta (Pinkerton & Kitner, 2006) o interactuar directamente con los juveniles J2 y desorientarlos para evitar que ingresen a la raíz (Giannakou, 2011).

- **Hongos nematófagos**

La habilidad de algunos microorganismos para controlar nematodos parásitos de plantas, recae en la capacidad de inducir resistencia en las plantas, degradar compuestos de señalización, infectar diferentes estadios del ciclo de vida del nematodo o colonizar las raíces, impidiendo la penetración de los juveniles infectivos (Kiewnick & Sikora, 2006; Lamovšek et al., 2013).

Muchos de los hongos que se reportan como controladores de *Meloidogyne* spp., tienen la capacidad de parasitar los estadios huevos o los juveniles J2 (Timper, 2014) y gracias a su capacidad para controlar este nematodo fitopatógeno y a su biología, pueden ser formulados. Existen reportes para formulaciones de *Trichoderma* spp. (Affokpon et al., 2011), *Pochonia clamydosporia* (Viggiano, de Freitas, & Lopes, 2014) y *Purpureocillium lilacinum* (Anastasiadis, Giannakou, Prophetou-Athanasiadou, & Gowen, 2008) como efectivos en controlar de forma *in vitro* y en planta. Estos organismos son altamente promisorios en el control de nematodos fitopatógenos; las principales dificultades que se

tienen son el establecimiento en suelo, la competencia con otros organismos y la variabilidad de su control dependiendo de las condiciones en las que se encuentra el sustrato en el que se adiciona (Lamovšek et al., 2013).

Dentro de las formas de acción de *Trichoderma* spp. en el control de especies de *Meloidogyne*, se reporta las interacciones que lleva a cabo con la matriz gelatinosa de las masas de huevos desde la zona apical de la hifa (Sharon, Chet, & Spiegel, 2009), permitiendo la adherencia del hongo a los huevos y posterior inhibición de la eclosión. En el caso de *P. lilacinum*, se ha visto asociada la producción de quitinasas y proteasas a la reducción de la eclosión y movilidad en estadios huevos y juveniles J2, respectivamente, de diferentes nematodos fitoparásitos, incluyendo *Meloidogyne* spp. (Kiewnick & Sikora, 2006). Gracias a estas características, algunos hongos han sido formulados y comercializados en diferentes países como EEUU (Bioact® - Bayer Cropscience), Cuba (KlamiC® - Censa) y Colombia (Instituto Colombiano Agropecuario-ICA, 2017a).

- **Bacterias**

En el caso de las bacterias, existen varios organismos que se reportan como capaces de inhibir la eclosión o disminuir la movilidad en nematodos fitopatógenos. La bacteria *Pasteuria penetrans* ha sido reportada como una de las principales bacterias encontradas como biocontroladora de *Meloidogyne* spp.; dada su especificidad, es clasificada como parásito intracelular de este nematodo y sus esporas, pueden permanecer en suelo por mucho tiempo y resistir condiciones extremas como altas temperaturas y sequía (Bird, Opperman, & Davies, 2003; Chen, Charnecki, Preston, & Dickson, 2000). En Colombia no se encuentran disponibles productos a base de este microorganismo a diferencia de EEUU en donde se distribuye Econem® (Syngenta).

Por parte de los organismos Gram negativos, especies de los géneros *Pseudomonas*, *Burkolderia* y *Serratia*, se han reportado no solo como endófitos en diferentes cultivos, sino también como microorganismos que tienen una relación directa con reducción en las nodulaciones en raíces y en las poblaciones de *Meloidogyne* spp. en suelo (Siddiqui & Shaukat, 2003). Los mecanismos de acción pueden ser competencia directa por nicho, inducción de resistencia en la planta o producción de moléculas antibióticas. En este sentido, se han reportado por ejemplo que el 2,4-diacetilfoloroglucinol es un metabolito

producido por *P. fluorescens* bajo ciertas condiciones de cultivo y tiene la capacidad de causar inmovilidad de juveniles J2 en *M. javanica* e inducción de resistencia en plantas de tomate (I. Siddiqui & Shahid Shaukat). Por otro lado, de las bacterias Gram positivas, los *Bacillus* spp. se han reportado como un género controlador eficaz del nematodo agallador mediante la producción de antibióticos, surfactantes y enzimas (Lee & Kim, 2015). Las especies de este género, han sido empleadas gracias a que pueden ser potencialmente formuladas en productos comerciales estables (Posada et al., 2016).

En los últimos años, la búsqueda de compuestos antagonistas o nematóxicos derivados de los productos de fermentación de diferentes microorganismos, se ha intensificado debido a que se encuentran varias toxinas, enzimas u otros compuestos producto del metabolismo que llevan a cabo (Nasr, 2015).

1.4 *Bacillus* spp. y sus moléculas nematicidas

Bacillus spp. son bacterias Gram positivas formadoras de endosporas presentes en muchos ambientes naturales. Muchas especies de pertenecientes a este género, son consideradas rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inlés), las cuales tienen capacidad de producir metabolitos antimicrobianos y enzimas que han sido reportadas como controladoras de nematodos parásitos de plantas, dentro de los que se encuentra *Meloidogyne* spp. (Aballay, Prodan, Zamorano, & Castaneda-Alvarez, 2017; Rainer, 2017). De acuerdo con esto, se han realizado estudios a nivel *in vitro* para corroborar la actividad nematicida de ciertos grupos bacterianos. Es el caso de *B. pumilus,* en donde tanto las células como el sobrenadante libre de células (SLC) redujeron la eclosión de huevos de *M. arenaria* en un 88.3% e inhibieron un 92.8% juveniles J2 del mismo nematodo (Lee y Kim, 2015). Adicionalmente, existen reportes para *B. subtilis* (Oliveira et al., 2014; Xia et al., 2011), *B. amylolquefasciens* (Abdel-Salam, Ameen, Soliman, Elkelany, & Asar, 2018) y *B. megaterium* (Padgham & Sikora, 2007), entre muchos otros.

En este sentido, se han estudiado los metabolitos implicados en la acción nematicida, con el fin de entender el mecanismo de acción, dentro de los cuales se ha establecido la producción de enzimas hidrolíticas (Aballay et al., 2017), proteolíticas (Perry et al., 2009) y otras moléculas como lipopéptidos cíclicos, los cuales tienen la capacidad de degradar la membrana del nematodo o intercalarse en la misma, interfiriendo en su estructura y función (Kavitha, Jonathan, & Nakkeeran, 2012; Zhao et al., 2018).

1.4.1 Enzimas

Las enzimas extracelulares hacen parte de ese coctel metabólico producido bajo diferentes condiciones de cultivo de *Bacillus* spp. La síntesis y producción de estas, se ve influenciada por los organismos con los cuales interactúan las bacterias. Es así como debido a la composición química de la membrana de los nematodos, existe relación entre el crecimiento por ejemplo de *B. pumilus* y la producción de quitinasas y proteasas para actuar como inhibidores de la eclosión de huevos de *M. incognita* (Lee & Kim, 2015).

Como parte de las enzimas reportadas para el control de nematodos, Niu y colaboradores (2006), encontraron la producción a nivel *in vitro* de una serin proteasa por parte de *B. nematocida* capaz de destruír en 48 h estadios larvales de *Bursaphelenchus xylophilus*, un nematodo patógeno de pino. Asimismo, *PaeniBacillus ehimensis* ha sido reportada para el control *in vitro* y en planta de *M. incognita*, mediante la producción de quitinasas, las cuales inhibieron en un 60% el porcentaje de eclosión de huevos, después de 5 d de evaluación (Hong, Anees, & Kim, 2013). Cabe destacar que muchas de estas enzimas son producidas en fermentaciones en las cuales se hace necesaria la adición al medio de cultivo de compuestos que sirven como precursores de éstas moléculas (Woo-Jin et al., 2002). Los modos de acción de estos metabolitos están estrechamente relacionados con la membrana de los nematodos. Es así como pueden interactuar con la membrana, provocando daños irremediables como lisis celular (Perry et al., 2009).

1.4.2 Lipopéptidos

Los lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp. tienen una estructura común, que consiste en una cola lipídica unida a un oligopéptido cíclico (Raaijmakers, de Bruijn, Nybroe, &

Ongena, 2010); difieren por la secuencia de aminoácidos, la longitud de las cadenas de ácidos grasos y características de la cadena cíclica (Villegas-Escobar, 2012) y son sintetizados por complejos multienzimáticos no ribosomales del microorganismo (González-Jaramillo, Aranda, Teruel, Villegas-Escobar, & Ortiz, 2017). Dentro de los lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp. se encuentran las surfactinas, iturinas y fengicinas, los cuales son metabolitos secundarios que pueden interactuar con los patógenos o competidores directos de las bacterias (Almaghrabi, Massoud, & Abdelmoneim, 2013).

La surfactinas e iturinas están compuestas estructuralmente de 7 α-aminoácidos y las fengicinas de 10 α-aminoácidos, las cuales están unidas a una cadena de ácidos grasos que varía en tamaño para cada lipopéptido (Ongena & Jacques, 2008). Estas estructuras han sido estudiadas por sus implicaciones en la formación de biopelícula (surfactinas e iturinas), actividad antibacterial y antifúngica (surfactinas, iturinas y fengicinas) y señalización celular con plantas (surfactinas) (Ongena & Jacques, 2008).

Las propiedades antimicrobianas se han asociado a su característica anfipática, lo cual les confiere capacidad de interactuar con las membranas de los diferentes organismos (Ongena & Jacques, 2008) y producir poros o vacuolaciones. Del mismo modo, pueden estar involucrados en la resistencia sistémica inducida, mediante la interacción directa con la planta. Para el caso de nematodos fitopatógenos, se reporta como las surfactinas e iturinas producidas por *B. subtilis*, fueron capaces de suprimir *in vitro* la eclosión de huevos e inhibieron juveniles J2 de *M. incognita* produjo altas concentraciones de (Kavita *et al*., 2012). De igual forma, existe reporte de como las surfactinas e iturinas aisladas desde *B. weihenstephanensis*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*, fueron efectivas solas y en combinación contra *M. ethiopica* (Tamalika & Ramakrishnan, 2016).

2. Materiales y métodos

2.1 Nematodo *Meloidogyne* sp.

2.1.1 Aislamiento y mantenimiento

El aislamiento del nematodo *Meloidogyne* sp. se realizó a partir de plantas de Sacha inchi provenientes de semillas denominadas El Arrullo, finca Santa Rosa en el corregimiento Camilo C. del municipio de Fredonia - Antioquia (6°11’06.2’’N/75°34’05.2’’W /1165 m.s.n.m.). Se colectaron 100 g de suelo y 30 g de raíces de plantas de Sacha inchi que presentaban sintomatología asociada a daño por nematodos (clorosis, enanismo, encrespamiento de hojas, nodulaciones en raíces).

Las muestras de suelo colectadas se combinaron con suelo abonado (composición: 1 arena: 0.5 tierra: 0.5 cáscara de arroz), previamente esterilizado (121°C por 40 min), en donde se sembraron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Santa Clara) de 20 d de crecimiento o semillas de Sacha inchi Katio-2 para multiplicar la población. Las plantas fueron ubicadas en el invernadero de la Universidad EAFIT a una temperatura entre 28 y 32 °C y un fotoperiodo de 12 h luz 12 h oscuridad; se regaron con agua corriente tres veces por semana, para mantener una humedad relativa constate. Se realizaron fertilizaciones quincenales para tomate con Triple 15® a una concentración de 3 g/L en 200 mL de agua para cada planta. Transcurridos 25 d de siembra de las pantas, aparecieron los signos de la enfermedad; se colectaron las raíces de 10 plantas, se lavaron con abundante agua y posteriormente se observó la presencia de hembras y masas de huevos con un estereomicroscopio (Stemidv4 Carl Zeiss).

2.1.2 Identificación de *Meloidogyne* sp.

Los nematodos obtenidos de plantas de Sacha inchi y tomate fueron identificados según el protocolo reportado por Perry y colaboradores (2009). Brevemente, se realizó inspección de las raíces del material vegetal para encontrar presencia de nodulaciones, con hembras al interior con masas de huevos contenidas en una matriz gelatinosa. Posteriormente, se realizó disección de las hembras y se realizaron cortes con el fin de aislar y fijar los patrones perineales característicos de este género. Los cortes aislados fueron comparados con claves taxonómicas reportadas para *Meloidogyne* spp. (Perry et al., 2009), teniendo en cuenta las características de los arcos dorsales y líneas laterales para la caracterización.

2.1.3 Obtención de huevos y juveniles J2 de *Meloidogyne* spp.

- **Huevos**

La extracción de los huevos de *Meloidogyne* spp. se realizó según la metodología descrita por Cardona-Bustos et al. (2014a). Para ello se dispusieron 50 g de pequeños trozos de raíces de tomate de 60 d después de inoculación (DDI) con *Meloidogyne* sp. en 200 mL de NaOCl al 1.0 % en frascos de vidrio con tapa. Los frascos fueron agitados manualmente durante 3 min y posteriormente la solución se separó a través de los tamices No. 120, 325 y 500. Del último tamiz, se realizó lavado con abundante agua corriente para eliminar el exceso de hipoclorito.

El contenido retenido en el tamiz No. 500 se recolectó en un frasco de vidrio y se tomaron 4 mL de esta solución y se combinaron con 10 mL de una solución de sacarosa al 70 % p/v, en tubos plásticos cónicos; se centrifugaron a 4500 rpm durante 25 min. El sobrenadante se filtró a través del tamiz No. 500 y se le realizó lavado con 300 mL de agua corriente estéril, para retirar el exceso de sacarosa. El contenido retenido en el tamiz, se recuperó y se sometió a tratamiento con una solución de NaOCl 1.0 % durante 10 min y luego con 10 ppm de oxitetraciclina (Genfar®) por 1 h, para eliminar microbiota asociada que pudiera intervenir como contaminante en las pruebas *in vitro*. Se realizaron nuevamente lavados sucesivos con agua corriente estéril. Finalmente, se recuperó el contenido del tamiz en frascos de vidrio estériles.

- **Juveniles en segundo estadio (J2)**

Para la obtención de estadios juveniles J2 se tuvo en cuenta lo reportado por Lee & Kim (2015) en donde se colectaron muestras de raíces de las plántulas de tomate con 60 DDI, las cuales se observaron bajo el estereomicroscopio para evidenciar la presencia de masas de huevos. Éstas se recuperaron con la ayuda de una aguja hipodérmica y se colocaron en cajas de Petri estériles de 5 cm de diámetro, las cuales contenían 5 mL de agua corriente estéril. En cada caja Petri se dispusieron 10 masas de huevos y se incubaron bajo oscuridad a 28 °C durante 6 d, período en el cual se colectaron los juveniles J2 mediante tamizaje por las mallas No. 120 y 325.

A la solución recuperada del último tamiz, se le realizó limpieza mediante tratamiento con hipoclorito de sodio al 1.0 % durante 10 min y posteriormente con oxitetraciclina (Genfar®) 10 ppm durante 1 hora. Se realizaron nuevamente lavados sucesivos con 500 mL de agua corriente estéril y se recuperó el contenido retenido en el tamiz No. 325. Esta solución se dispensó en tubos cónicos de plástico junto con una solución de sacarosa al 70 % p/v en una proporción 2:5. Los tubos se centrifugaron a 4500 rpm durante 25 min y luego se filtró el sobrenadante por el tamiz No. 325, en donde quedaron retenidos los juveniles J2. Se lavó la solución retenida con 500 mL de agua corriente estéril y posteriormente se recuperó el contenido del tamiz en un frasco de vidrio estéril.

2.2 Productos nematicidas

Los productos nematicidas evaluados fueron preparados en soluciones acuosas para las pruebas *in vitro* y de invernadero. Las dosis evaluadas fueron aquellas recomendadas por el fabricante para un cultivo agrícola con densidades de siembra similares a las de Sacha inchi (

Tabla 2-1). Todos los productos nematicidas son de comercialización nacional y tienen registro ICA para su uso.

Tabla 2-1: Productos nematicidas de origen químico, vegetal y biológico seleccionados para las evaluaciones *in vitro* y en invernadero.

Tipo de producto	Producto	Ingrediente activo	Dosis recomendada	Proveedor
Extracto vegetal	**Eco A-Z®**	Extracto de ajo	1.0 cc/L	Ecoflora Agro S.A.S.
	QL Agri®	Extracto de quillay	25 L/ha	BASF S.A.
	Sincocin®	Ácidos grasos naturales y extractos de plantas	1.5 L/ha	Magro S.A.
Agente de control biológico	**Nemata®**	*Paecilomyces lilacinus* cepa DMS 15169	0.25 L/ha	Live systems technology S.A.
	Safelomyces®	*P. lilacinus*	0.5 kg/ha	Natural Control Ltda.
	Safersoil®	*Trichoderma asparellum*, *T. atriviride*, *T. harzianum*, *P. lilacinus*.	0.5 kg/ha	Safer Agrobiológicos S.A.S.
Plaguicida químico	**Larvin®**	Tiodicarb	0.9 L/ha	Bayer S.A.
	Rugby®	Cadusafos	33.3 kg/ha	FMC Corporation
	Verango®	Fluopyram	1.0 L/ha	Bayer S.A.

2.3 Microorganismos bacterianos

2.3.1 Almacenamiento e identificación

Los microorganismos bacterianos evaluados a nivel *in vitro* y de invernadero para el control del nematodo *Meloidogyne* sp. hacen parte de la "Colección de Bacterias asiladas de *Musa* sp." con registro No. 191 del Registro Único Nacional de Colecciones Biológicas del Instituto Alexander Von Humboldt. Las cepas de *Bacillus* sp. (Tabla 2-2) fueron almacenadas a -80 °C en medio TSB (Triptyc Soy Broth, Oxoid®) suplementado con glicerol al 20 % v/v y activadas en TSA x 0.5 (Tryptic Soy Agar, Oxoid®) por 48 h a 30°C antes de cualquier uso experimental. La identificación de las cepas bacterianas se realizó mediante la secuenciación del gen 16s rDNA.

Tabla 2-2: Origen y caracterización de cepas de *Bacillus* spp.

Cepa	Identificación (16S DNAr)	Número de accesión[a]	Origen[b]
EA-CB0015	*Bacillus subtilis*	GQ360077	FG
EA-CB0070	*Bacillus pumilus*	EF174536.1	RG
EA-CB0305	*PaeniBacillus* sp.	HQ897157.1	RP
EA-CB0575	*Bacillus subtilis*	GQ360077	RV
EA-CB0579	*Bacillus gibsonii*	HM582875.1	RG
EA-CB0686	*Bacillus altitudinis*	GQ870077	RP
EA-CB0784	*Bacillus megaterium*	HQ360087	RV
EA-CB0959	*Bacillus amyloliquefaciens*	HM585066	FP
EA-CB1329	*Bacillus amyloliquefaciens*	HQ407277	FV

[a] Identificación en base de datos de GenBank
[b] Origen de aislamiento; R: rizosfera, F: filosfera, P: plátano cv. Hartón, V: banano cv. Valery, G: banano cv. Gran enano.

2.3.2 Obtención de SLC y sobrenadantes bacterianos

Con el fin de obtener el sobrenadante y el sobrenadante libre de células (SLC) de cada cepa bacteriana, se realizó un cultivo sumergido y una posterior centrifugación y filtración.

Para ello, se inoculó una colonia de cada cepa bacteriana en 20 mL de medio D (Mosquera, González-Jaramillo, Orduz, & Villegas-Escobar, 2014) contenidos en un matraz de 100 mL. El medio D contenía (g /L): glucosa, 33.4; MgSO4.7H2O, 4; K2HPO4 y KH2PO4, 0.5 de cada uno; extracto de levadura (Oxoid®), 32.5; (NH4)2SO4, 1; CaCl2, 0.031 y MnSO4.4H2O, 0.042. Cada cultivo bacteriano se incubó a 30°C durante 5 d con agitación a 110 rpm. Para obtener el SLC bacteriano, transcurrido el tiempo de fermentación se realizaron dos centrifugaciones sucesivas a 14000 rpm durante 10 min a 4 °C, se recuperaron los sobrenadantes y posteriormente, se filtraron por una membrana de acetato-celulosa con un tamaño de poro de 0.20 µm.

En el caso de la obtención de los sobrenadantes para las pruebas en invernadero, los cultivos sumergidos se realizaron en matraces de 1000 mL con 180 mL de medio de cultivo D y 20 mL de un preinóculo de 12 h de crecimiento. Transcurridos 5 d de incubación a 30°C y 110 rpm, se realizaron dos centrifugaciones sucesivas de cada fermentación en tubos cónicos de plástico de 50 mL a 4500 rpm durante 30 min a 4 °C.

2.4 Evaluaciones *in vitro*

Con el fin de determinar el efecto de los productos nematicidas y de los SLC bacterianos sobre los diferentes estadios de *Meloidogyne* sp. se realizaron evaluaciones *in vitro* según la metodología descrita por Siddiqui & Shahid Shaukat (2003). En cajas de Petri de 5 cm de diámetro, se adicionaron 2 mL de cada tratamiento (producto nematicida o SLC) con 150 huevos o 50 individuos en segundo estadio juvenil J2, según fuera el caso. En las evaluaciones con los SLC, se adicionó el antibiótico oxitetraciclina (Genfar®), a una concentración final de 10 ppm en cada unidad experimental y en todos los tratamientos, con el fin de evitar contaminación durante la evaluación. El control para la prueba de

nematicidas fue agua corriente estéril; para las pruebas con SLC, los controles fueron medio D fresco estéril, medio de cultivo D al 20 % v/v y agua corriente estéril.

Las cajas Petri se incubaron a 28°C por 48 h y posteriormente se determinó dependiendo del experimento, bien fuera la cantidad de huevos eclosionados o de juveniles J2, con la ayuda del microscopio invertido (Axio Vert. A1 Carl Zeiss). A partir de estos datos se calculó el porcentaje de eclosión de huevos y el porcentaje de inmovilidad con la Ecuación (2-1) y la Ecuación (2-2), respectivamente. Se tuvieron 5 repeticiones por tratamiento, para el caso de los nematicidas y 4 para los SLC, con dos réplicas en tiempos independientes.

$$\%\ eclosión = \frac{Huevos\ eclosionados}{Huevos\ totales} * 100 \quad (2\text{-}1)$$

$$\%inmovilidad\ = \frac{Jueveniles\ J2\ inmóviles}{Jueveniles\ J2\ totales} * 100 \quad (2\text{-}2)$$

2.5 Evaluaciones a nivel de invernadero

2.5.1 Ensayo con nematicidas

El efecto de los productos nematicidas Sincocin®, QL Agri®, Safelomyces®, Safersoil®, Rugby® y Verango® en la respuesta de plantas de Sacha inchi y tomate inoculadas con *M. incognita*, fue evaluado a nivel de invernadero. Los nematicidas se prepararon en un volumen final de 40 mL de agua corriente a la dosis recomendada por el fabricante (Tabla 2-1). Esta solución fue mezclada con 1 kg de sustrato suelo (1 arena: 0.5 tierra: 0.5 cáscara de arroz) en bolsas de siembra e inmediatamente se sembraron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Santa Clara) de 20 d de edad o semillas de Sacha inchi, según fuera el experimento. Un DDI (días después de inoculación) del producto nematicida, se inocularon 9000 huevos de *Meloidogyne* sp./planta. Para el caso del control negativo se

adicionaron solo huevos sin producto nematicida; se dispusieron 5 repeticiones de cada tratamiento en forma aleatoria.

En una segunda evaluación en tomate, se tuvieron las mismas condiciones para las unidades experimentales, pero fue duplicada la dosis de los nematicidas (2X) y se aumentaron las repeticiones a 10. Los experimentos se realizaron bajo un diseño completamente aleatorio y las condiciones del invernadero, riego y fertilización fueron las mismas detalladas en el numeral 2.1.1.

Para ambos experimentos en tomate, las plantas fueron cosechadas 30 DDI del nematodo, y para Sacha inchi 35 DDI. Las plantas fueron procesadas para determinar el peso fresco radicular y aéreo, el peso seco aéreo, el número de nódulos totales/raíz y los huevos/g de raíz según se describe en el numeral 2.5.3.

2.5.2 Evaluación con sobrenadantes bacterianos

El efecto de los sobrenadantes en las nodulaciones ocasionadas *Meloidogyne* sp. en plantas de tomate, fue evaluado a nivel de invernadero según el método descrito por Khan et al., (2008) con algunas modificaciones. Las raíces de plántulas de tomate de 25 días de edad fueron sumergidas en 10 mL de cada sobrenadante bacteriano obtenido como se describe en el numeral 1.1.1, durante 1 min; luego, cada planta se sembró en bolsas de siembra con 1 kg de sustrato orgánico y el sobrenadante sobrante después de la inmersión, se adicionó alrededor de la raíz rizosfera de la planta. Transcurridos 7 d después de la aplicación del sobrenadante, se realizó la inoculación de 9000 huevos/planta. Como controles negativos se emplearon: 1) medio de cultivo D fresco estéril y 2) agua corriente estéril, ambos con plantas inoculadas con nematodo solamente. Todas las plantas se mantuvieron en invernadero bajo las mismas condiciones descritas en la sección 2.1.1.

Transcurridos 35 DDI de los huevos, se procesaron las plantas para determinar el peso fresco radicular y aéreo, el peso seco aéreo, el número de nódulos totales/raíz y los huevos/g de raíz según se describe en el numeral 2.5.3. En la segunda réplica independiente en el tiempo, las plantas fueron cosechadas 48 DDI de los huevos, y se usó adicionalmente otro control negativo correspondiente a medio de cultivo D fresco estéril

diluido al 20%. Los experimentos se realizaron bajo un diseño completamente aleatorio con 10 repeticiones por tratamiento.

2.5.3 Determinación de variables de crecimiento y de enfermedad

Las plantas tratadas con los nematicidas (sección 2.5.1) o los sobrenadantes bacterianos (sección 2.5.2) fueron extraídas cuidadosamente del suelo, separando las raíces de la parte aérea. Las variables de crecimiento peso fresco aéreo y radicular se obtuvieron registrando directamente el peso de la planta; para el caso del peso seco aéreo, las plantas fueron dispuestas en bolsas de papel y sometidas a secado a 60 °C durante 3 d. Se sacaron y se registró el peso seco de las mismas.

Los daños ocasionados a nivel radicular por *Meloidogyne* sp. se evaluaron mediante la determinación de las variables del número de número de huevos/g raíz y de nódulos totales/g raíz. Para la primera variable se utilizó el método descrito por Cardona *et al.* (2014b) con algunas modificaciones, en el cual las raíces se cortaron en pequeños trozos y se introdujeron en un matraz d vidrio que contenía 50 mL de NaOCl 1%; se llevaron a agitación a 260 rpm durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se separó la solución a través de los tamices No. 120 y 500, recuperando de este último lo que quedaba retenido, en un volumen final de 20 mL. Una vez recuperada la solución, se procedió a recuento de huevos/mL en alícuotas de 1 mL para extrapolar al volumen final, con la ayuda del microscopio invertido (Stemidv4 Carl Zeiss). Para llegar a número de huevos/g raíz, se tuvo en cuenta el peso fresco de la raíz para determinar esta variable. En el caso de la variable nódulos totales/g raíz, se contaron todas las nodulaciones presentes en la raíz y se dividió por el peso fresco de la misma.

2.6 Caracterización fisicoquímica de los SLC

La caracterización fisicoquímica de los SLC de las bacterias *B. subtilis* EA-CB0015, *B. pumilus* EA-CB0070 y *B. gibsonii* EA-CB0579 se realizó con el fin de determinar la estabilidad de la actividad nematicida a la acción de diferentes pH, temperaturas y a acción de la proteinasa K siguiendo el método reportado por Yu et al. (2002).

2.6.1 pH

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad de los SLC, se ajustó el pH de cada SLC a 2 o 10 con HCl 5M o NaOH 5M, según fuera el caso. Luego de esto, los tratamientos fueron incubados a 20 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se restituyó el pH de cada uno de los SLC al pH original y se evaluó el efecto del SLC tratado sobre la eclosión de huevos del nematodo *Meloidogyne* sp. como se describió en la sección 2.4. El diseño experimental fue un diseño completamente aleatorio con 4 repeticiones por tratamiento. Como controles negativos se empleó 1) medio de cultivo D fresco estéril tratado también a los diferentes pH y con restitución del pH al original, 2) agua estéril, y 3) SLC sin tratar como control positivo.

2.6.2 Temperatura

El efecto de la temperatura sobre la actividad de los SLC se evaluó sometiendo 2 mL de cada SLC a 50, 70 y 100 °C durante 30 min. Una vez recuperada la temperatura ambiente, se procedió a evaluar el efecto de los SLC tratados frente a la eclosión de huevos de *Meloidogyne* sp. como se describió en la sección 2.4. El diseño experimental fue un diseño completamente aleatorio con cuatro repeticiones por tratamiento. Como controles negativos se empleó 1) Medio de cultivo D fresco estéril sometido a las diferentes temperaturas, y 2) agua estéril; y 3) como control positivo el SLC sin tratamiento con temperaturas.

2.6.3 Proteinasa K

Los SLC de las cepas seleccionadas (sección 1.1) se trataron con proteinasa K (Promega®) a una concentración de 1 mg/mL de SLC; se incubaron a 37 °C durante 4 h y se detuvo la reacción de la enzima sometiendo los SLC a 100 °C por 2 min. Se tuvo en cuenta otro tratamiento que consistió en los SLC bacterianos sin adición de la enzima y sometidos a las temperaturas de reacción y de inactivación de la proteinasa K. Los tratamientos para esta prueba tuvieron 4 repeticiones cada uno y se consideraron como controles negativos 1) medio de cultivo fresco D al 20%, 2) agua corriente estéril y como controles positivo 3) SLC sin tratamiento con la enzima.

2.7 Purificación de compuestos activos contra *Meloidogyne* sp.

2.7.1 Separación en fase sólida SPE

Con el fin de determinar la actividad nematicida de las fracciones separadas por SPE (Solid Phase Extraction), los SLC de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. gibsonii* EA-CB0579, se sometieron por separado a extracción en una columna SPE C18 de 500 mg (J.T. Baker). Inicialmente, la columna se acondicionó con 4 mL de metanol y 4 mL de agua desionizada. Luego, se dispusieron 2.5 mL de cada SLC por separado y se fraccionaron adicionando por etapas 4 mL de agua (fracción 1), 4 mL de metanol 50% (fracción 2) y 4 mL de metanol 100% (fracción 3) respectivamente. Este procedimiento se repitió para recuperar los metabolitos de 5 mL de SLC y posteriormente concentrar cada fracción 2X. Las fracciones recuperadas se concentraron en una centrífuga (Concentrator Plus Eppendorf®) operada a 45 °C, 1000 rpm y una presión absoluta de 20 mbar; el pellet de cada fracción se resuspendió en 2.5 mL de buffer fosfato 0.1 M pH 7.5 y se filtraron a través de una membrana de celulosa-acetato de 0.2 µm.

2.7.2 Purificación por RP-HPLC

De la fracción 3 de la cepa *B. subtilis* EA-CB0015 obtenida en el numeral 2.7.1, se purificaron los lipopéptidos según método propuesto por Villegas-Escobar et al. (2013). Se partió de una fermentación bajo las mismas condiciones de cultivo detalladas en el numeral 1.1.1, modificando que transcurridas 24 h, se adicionó la resina amberlita XAD16® a una concentración de 4% del volumen final de fermentación. Transcurridos 5 d, la resina fue recuperada y lavada tres veces con 200 mL de agua desionizada; luego se dispuso la resina amberlita en una columna de vidrio con filtro de vidrio sinterizado, donde se eluyeron los metabolitos absorbidos por la resina con metanol 100%. El producto eluído se recuperó y fue evaporado a presión reducida (50 psig, 50ºC); el residuo recuperado fue resuspendido en agua desionizada y ajustado a una concentración de 37 mg/mL, el cual fue fraccionado por medio de extracción por SPE en una columna C18 de 10 g (J.T. Baker), siguiendo el mismo gradiente descrito en el numeral 2.7.1 y adicionando por etapas 80 mL de fase móvil.

La fracción 3 (100% metanol), se evaporó a presión reducida (50 psig, 50ºC) hasta que se obtuvo un residuo sólido, el cual se ajustó a una concentración de 20 mg/mL con metanol 100%. Se comenzó entonces con la separación usando cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), teniendo como fase estacionaria una columna Eclipse C18 (250 x 9.5 mm, 5 µm, Agilent®) y una fase móvil de 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) en agua (A) y 0.1% TFA en acetonitrilo (B). Se inyectaron 20 µL de las muestras a la columna y se empleó un gradiente que comprendió desde 30 hasta 100% de B en 75 min, 100% de B por 10 min, a un flujo de 1 mL/min a 30 °C y una detección UV a 214 nm. Se recuperaron por separado las fracciones eluidas desde el minuto 14 hasta el 23, que corresponden a las iturinas (Itu), desde el minuto 29 al 50 que corresponden a las fengicinas (Fen) y desde el minuto 70 al 80, a las surfactinas (Sur) (Anexo 2). Finalmente, las fracciones fueron evaporadas a 50 psig, 50ºC y disueltas en buffer fosfato 0.1 M pH 7.5, ajustando la concentración a la requerida para la prueba *in vitro*.

2.7.3 Prueba *in vitro*

Se evaluó la respuesta en la eclosión de huevos de *Meloidogyne* sp. frente a las fracciones recuperadas en el numeral 2.7.1. Para este ensayo, se utilizaron microplatos de 12 pozos, en los cuales se tuvieron tratamientos por cuadruplicado que consistieron en cada fracción recuperada y resuspendida en buffer fosfato (fracción 1, fracción 2 y fracción 3) y como controles negativos se tuvo 1) agua corriente estéril y 2) medio D al 20%; como controles positivos de empleó 3) SLC. A cada tratamiento se le adicionó oxitetraciclina (Genfar®) a una concentración final de 10 ppm además de aproximadamente 100 huevos de *Meloidogyne* sp. Los microplatos fueron aleatorizados e incubados bajo las mismas condiciones que se detalla en el numeral 2.4.

En el caso de las fracciones purificadas parcialmente por RP-HPLC para la cepa *B. subtilis* EA-CB0015, se realizó un experimento en microplatos de 96 pozos, con 18 repeticiones por tratamiento, los cuales consistieron en cada una de las fracciones recuperadas (itu, fen y surf) y ajustadas a dos concentraciones, las cuales fueron determinadas según reportes previos en los que se cuantificó la producción de lipopéptidos en medio D (González-

Jaramillo et al., 2017; Mosquera et al., 2014). A partir de esto, se determinó que para la concentración 1X, los lipopéptidos se evaluaron en las concentraciones de: Itu a 355 ppm, Fen a 752 ppm y Sur a 302 ppm. Para el tratamiento a 2X, se duplicaron estas concentraciones. Como control negativo se empleó agua corriente estéril y como controles positivos la fracción 3 (SPE) a dos concentraciones: 1X equivalente a 0,52 mg/mL y 2X equivalente a 1 mg/mL. La variable respuesta fue el porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne* sp. Los microplatos se incubaron a 28 °C durante 5 d, en donde se realizaron lecturas a las 48 h y a las 120 h.

2.8 Diseño experimental y análisis estadístico

Para todos los experimentos se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con un nivel de confianza del 95%. Para verificar la normalidad de los datos se utilizó el estadístico de prueba Shapiro Wilks y los supuestos de igualdad de varianzas, por medio del estadístico de Bartlett´s. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para diferencias entre medias de los tratamientos y pruebas de comparación múltiple con el estadístico de prueba Tukey para determinar grupos homogéneos. Aquellos datos que no cumplieran supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas, se analizaron mediante pruebas no paramétricas por Kruskall-Wallis; todos los análisis se ejecutaron en el software RStudio 1.1.383.

3. Resultados

3.1 Caracterización e identificación de los aislamientos de *Meloidogyne* sp.

Las raíces de plantas de Sacha inchi colectadas de un cultivo en Fredonia (Antioquia) presentaron nodulaciones características de infección por nematodos del género *Meloidogyne* spp. (Figura 3-1 a y b). Al realizar inspección del material encontrando, había hembras dentro de la raíz con formación de masas de huevos externas. Las hembras extraídas para posterior corte y aislamiento de patrones perineales, tenían una coloración rojiza (Figura 3-1 c), característica que se ha observado en la interacción nematodo - Sacha inchi y se ha reportado por otros autores, atribuyéndole esta coloración a la posible interacción de las hembras con algún compuesto adquirido desde el hospedero (Wang et al., 2014).

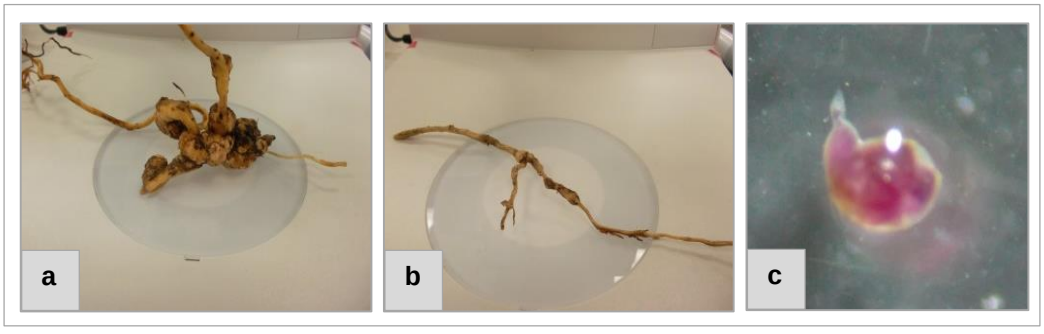


Figura 3-1: Muestras colectadas del sistema radicular de un cultivo de Sacha inchi provenientes de la Finca Agroindustrias Amazónicas (Fredonia, Colombia) para el aislamiento de *Meloidogyne* spp. a) y b) Muestras radiculares procesadas; c) Hembra de *Meloidogyne* sp. extraída desde la raíz de Sacha inchi.

Al caracterizar las hembras encontradas en las muestras de plantas, se inició la reproducción del fitopatógeno en tomate (*Solanum lycopersicum* var. Santa Clara), el cual ya había sido utilizado por Wang y colaboradores en el 2014 como planta modelo de la interacción entre el nematodo y plantas de Sacha inchi.

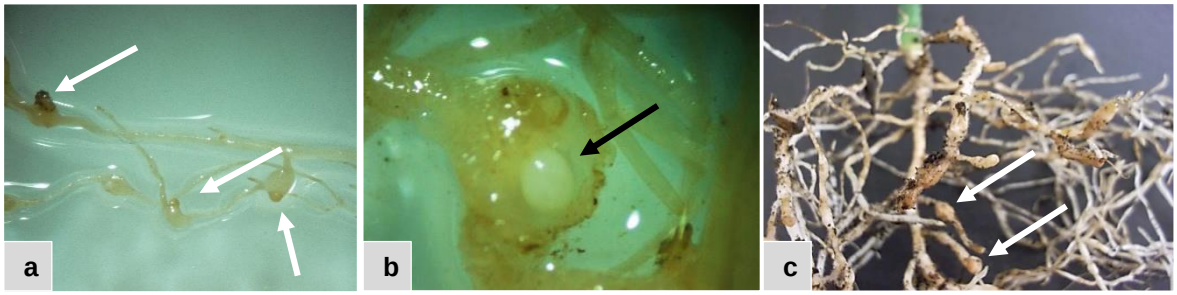


Figura 3-2: Sintomatología causada por *Meloidogyne* sp. en plantas de tomate y de sacha inchi; a) Nodulaciones radiculares en tomate (*Solanum lycopersicum* var. Santa Clara) 25 d después de siembra; b) Detalle de hembra en una nodulación en tomate sembrado en invernadero. c) Signos de infección de *Meloidogyne* sp. en Sacha inchi Katio-2. Las flechas blancas señalan las nodulaciones; la flecha negra muestra una hembra dentro de la nodulación de tomate.

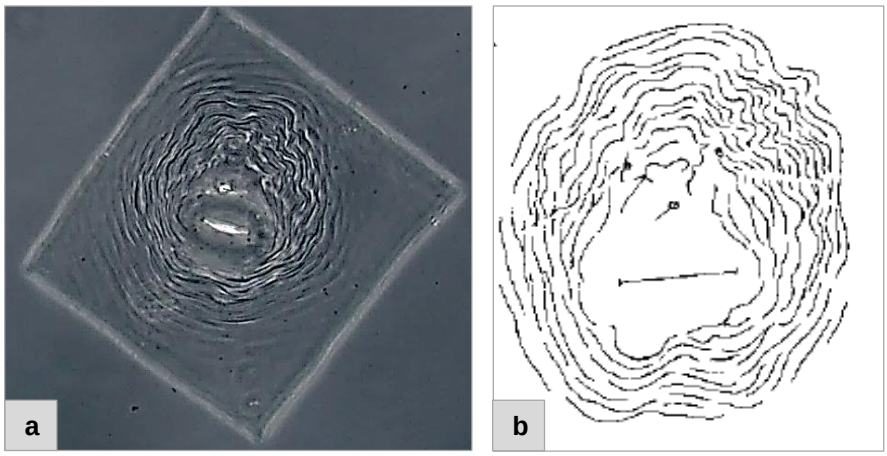


Figura 3-3: Comparación de patrones perineales de hembra de *Meloidogyne* sp. aislada de tomate; a) Corte realizado en hembra extraída desde nodulación de tomate; b) Imagen tomada de Perry et al., 2009. P. 69, con patrón perineal de *M. incognita*.

El ciclo de infección, bajo condiciones de invernadero, tuvo una duración de 25 d después de haber sido inoculadas las plantas, evidenciándose formación de nodulaciones, crecimiento retardado y clorosis, signo y sintomatología características de la infección por

Meloidogyne spp., lo que permitió mantener producción del nematodo en tomate bajo condiciones de invernadero (Figura 3-2).

La comparación de los patrones perineales realizados para 15 hembras extraídas desde tomate, según metodología de Perry y colaboradores en el 2009, permitió determinar que las hembras analizadas, pertenecían posiblemente a la especie *M. incognita* ya que presentaron un arco dorsal alto y ligeramente achatado, así como la línea lateral presente en esta especie (Figura 3-3**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Esta especie también se ha reportado previamente en otros estudios como causante de infección en Sacha inchi (Márquez et al., 2007).

3.2 Selección de nematicidas y SLC a nivel *in vitro*

3.2.1 Nematicidas comerciales

Con el fin de determinar el efecto de diversos productos nematicidas comerciales sobre *M. incognita* a nivel *in vitro*, se evaluó su acción sobre la eclosión de huevos (Figura 3-4) y sobre estadios juveniles J2 (Figura 3-5). Los resultados obtenidos, en cuanto a la eclosión de huevos, evidencian que todos los productos de origen químico y vegetal, tuvieron diferencias estadísticamente significativas frente al control (Figura 3-4), mientras que en el caso de los nematicidas de origen biológico, dos de los productos utilizados (Safelomyces® y Safersoil®) tuvieron la capacidad de reducir la eclosión de los huevos de *M. incognita* respecto al control no tratado.

El grupo de nematicidas que tuvo el mayor porcentaje de reducción en la eclosión de huevos respecto al control fue el de los químicos, con porcentajes del 57% (Rugby®), 50% (Vernago®) y 33% (Larvin®), seguidos de los nematicidas de origen vegetal, con reducciones del 49% (Sincocin®), 43% (QL Agri®) y 15% (Eco AZ®). En el caso de los nematicidas biológicos, los porcentajes de reducción fueron significativos para Safelomyces® y Safersoil®, con reducciones del 23 y 15%, respectivamente. El nematicida biológico Nemata® por su parte, redujo un 11% la eclosión de huevos de *M. incognita.* Esta evaluación se realizó 2 veces en tiempos independientes con resultados reproducibles.

Al evaluar el efecto de estos productos sobre el estadio juvenil J2 de *M. incognita* (Figura 3-5), se encontró que los nematicidas químicos Rugby®, Verango® y Larvin® redujeron significativamente el porcentaje de movilidad de J2 en un 87, 77 y 13% respectivamente con relación al control (agua); para el caso de los nematicidas vegetales y biológicos, se obtuvieron reducciones menores del porcentaje de movilidad. De este modo, los productos nematicidas Safelomyces®, EcoAZ®, QL Agri®, Nemata® y Safersoil® redujeron la movilidad de J2 en un 37, 23, 20, 14 y 12%, respectivamente, mientras que Sincocin® no tuvo un efecto significativo.

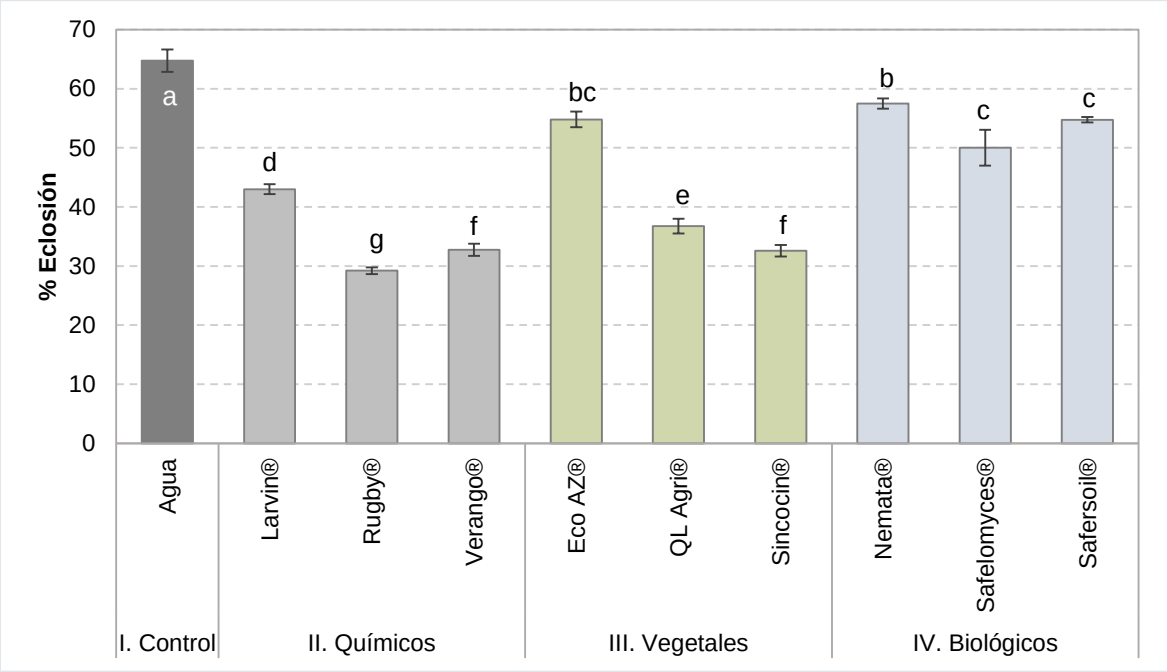


Figura 3-4: Efecto de diferentes productos nematicidas comerciales sobre la eclosión de huevos de *M. incognita* a nivel *in vitro*. Letras diferentes denotan diferencias significativas (p-valor = 6.107051e-06), mediante diferencias de medias por Kruskall-Wallis. Barras verticales denotan error estándar (n = 5).

En el caso de los nematicidas de origen vegetal evaluados, Sincocin® y QL Agri® tuvieron porcentajes mayores en la reducción de la eclosión de huevos de *M. incognita* que en la movilidad de los juveniles J2, respecto a un control no tratado. Adicionalmente, el producto EcoAZ® tuvo un efecto inhibitorio significativo en huevos de *M. incognita*, aunque con un menor efecto que Sincocin® y QL Agri®; mientras que su efecto contra juveniles J2 del nematodo fue estadísticamente similar al de QL Agri®.

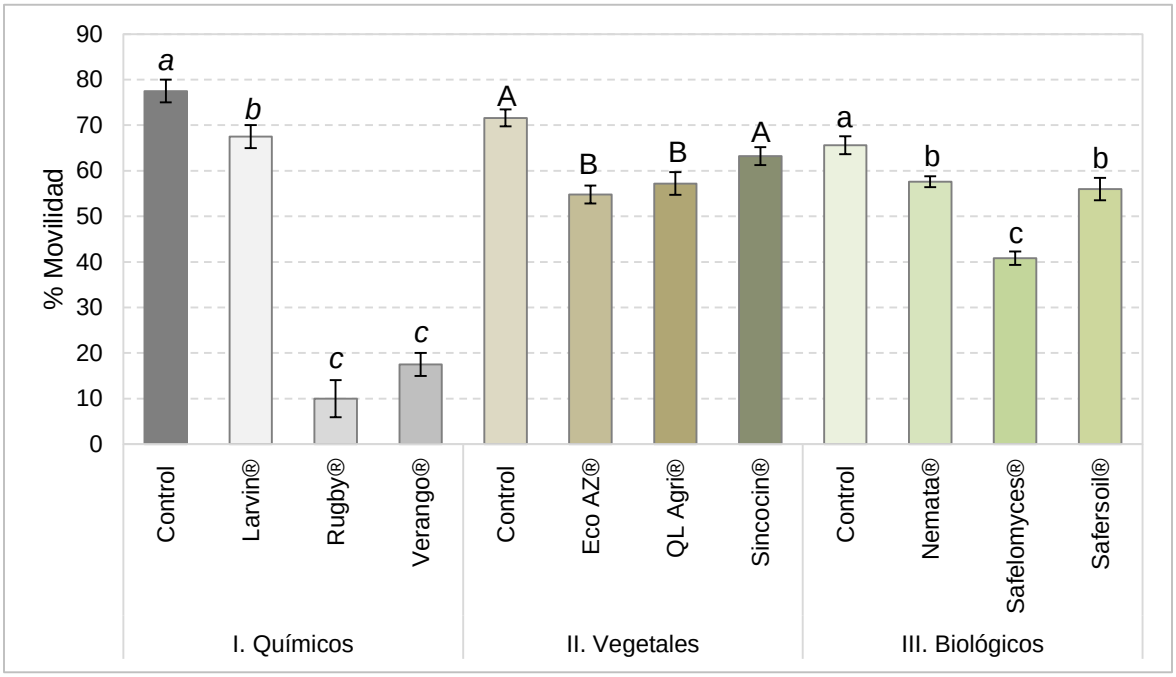


Figura 3-5: Efecto de diferentes productos nematicidas comerciales sobre la movilidad de estadios juveniles J2 de *M. incognita* a nivel *in vitro*. Letras diferentes denotan diferencias significativas respecto a un control no tratado (letras minúsculas y cursivas para nematicidas químicos, p-valor = 1.803e-09; letras mayúsculas a nematicidas extractos vegetales, p-valor = 1.5e-04 y minúsculas a biológicos, p-valor = 5.284e -07), según rangos múltiples de Tukey. Barras verticales denotan error (n = 4 para nematicidas químicos y n = 5 para nematicidas vegetales y biológicos).

En cuanto a los resultados para nematicidas de origen biológico, Safersoil® y Safelomyces® tuvieron mayores porcentajes de reducción tanto de la eclosión de huevos de *M. incognita* como de la movilidad de juveniles J2, que el producto Nemata®. Los tres nematicidas tienen en común cepas diferentes de *P. lilacinum* lo que podría sugerir que las cepas que contienen los productos Safersoil® y Safelomyces® son más eficientes en las evaluaciones *in vitro*. Para el caso de *Trichoderma* spp. presente como uno de los ingredientes activos en Safersoil® (

Tabla 2-1), la capacidad de este microorganismo de inhibir la eclosión de huevos ha sido reportada en algunos trabajos (Affokpon et al., 2011; Radwan et al., 2012a), lo que sugiere que la acción del producto Safersoil® se ve potenciada al tener dos géneros de microorganismos que son capaces de controlar *Meloidogyne* spp.

Para explicar que los porcentajes de disminución de la eclosión en los nematicidas biológicos evaluados, son menores que los de origen químico y vegetal, se hace necesario pensar en la naturaleza de los mismos, ya que mientras los primeros tienen la necesidad de establecerse en un ambiente apropiado para su crecimiento (Collange, Navarrete, Peyre, Mateille, & Tchamitchian, 2011; V. Singh, Mawar, & Lodha, 2012), los químicos y vegetales son la molécula dispuesta a interactuar de forma directa con los organismos de interés para control, lo que puede asegurar un modo de acción más directo aunque posiblemente no prolongado (Rahman Khan et al., 2014).

3.2.2 SLC tienen efecto nematicida sobre *M. incognita*

La capacidad de los SLC de diferentes BAFEs de reducir la eclosión de huevos de *M. incognita* y la movilidad de J2 son presentados en la Figura 3-6 y Figura 3-7**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, respectivamente. En ambas figuras se observa que todos los SLC bacterianos redujeron significativamente el porcentaje de eclosión de huevos y la movilidad de los estadios J2 de *M. incognita* a nivel *in vitro*. En general, los SLC de las cepas bacterianas evaluadas, tuvieron porcentajes de reducción de la eclosión por encima del 60 % (*B. pumilus* EA-CB0070 94%, *B. PaeniBacillus* sp. EA-CB0305 90%, *B. altitudinis* EA-CB0686 84%, *B. megaterium* EA-CB0784 81%, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 y EA-CB1329 72%, *B. subtilis* EA-CB0575 78% y EA-CB0015 65% y *B. gibsonii* EA-CB0579 69%).

Para el caso del inserto en laFigura 3-6, se muestra la comparación entre el control agua y el medio D fresco. Los resultados muestran que existe una diferencia levemente significativa entre ambas soluciones (p-valor = 0.054), con una eclosión de los huevos en el medio D 30% superior a la eclosión en agua. Este resultado sugiere que la composición del medio pudo haber ocasionado que los huevos eclosionaran más que en agua, lo que reafirma la actividad de los SLC bacterianos evaluados, debido a que sin importar la capacidad del medio D de permitir y aumentar la eclosión de los huevos, todos los SLC bacterianos tuvieron la capacidad de reducir significativamente la eclosión de los huevos y la movilidad de los juveniles J2 de *M. incognita*.

De forma similar a la prueba de eclosión de huevos de *M. incognita*, la evaluación del efecto del control agua y del medio D en la movilidad de los juveniles J2 (inserto Figura 3-7), arrojó diferencias entre ambos tratamientos, sugiriendo que existe un efecto de los nutrientes del medio D en activar la movilidad de las larvas de *M. incognita*, aunque esto no impidiera que los SLC de las BAFEs redujeran la actividad del nematodo.

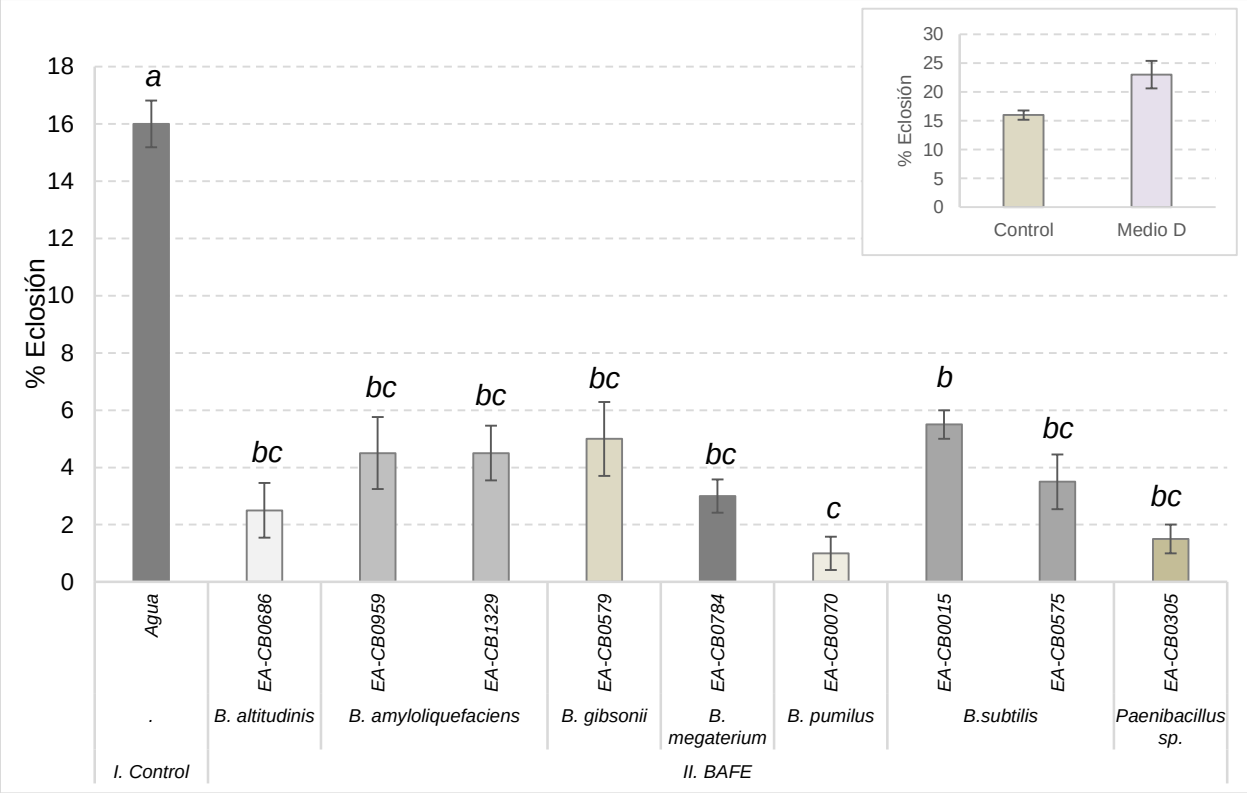


Figura 3-6: Efecto de los SLC bacterianos sobre la eclosión de huevos de *M. incognita* a nivel *in vitro.* Letras diferentes denotan diferencias significativas respecto al control agua, según rangos múltiples de Tukey (p-valor = 4.199e-11). El inserto representa la comparación entre las medias del control (agua) y medio D fresco estéril (p-valor = 0.054). Barras verticales denotan error estándar (n = 4).

Al evaluar el efecto de los SLC bacterianos respecto a la movilidad de juveniles J2 (Figura 3-7), las cepas *B. altitudinis* EA-CB0686 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB1329 obtuvieron porcentajes de reducción de la movilidad de 86% y 65%, respectivamente, respecto al control agua, mientras que las cepas restantes tuvieron valores de porcentaje de reducción por encima del 95%.

De forma general, todos los SLC bacterianos evaluados redujeron la eclosión de huevos y la movilidad de juveniles J2 de *M. incognita*, lo que sugiere que estas bacterias evaluadas tienen la capacidad de producir metabolitos inhibitorios del nematodo, lo que conlleva a que *M. incognita* no culmine su ciclo de vida.

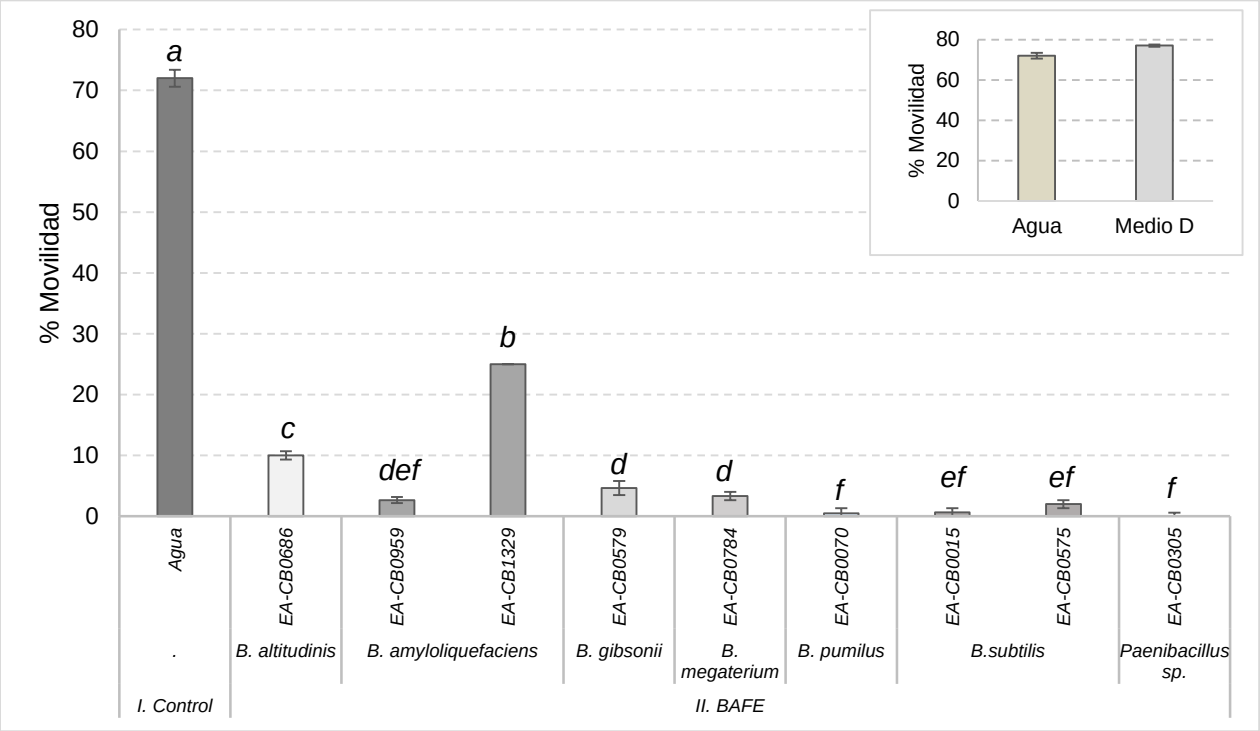


Figura 3-7: Efecto de los SLC bacterianos sobre la movilidad de juveniles J2 de *M. incognita* a nivel *in vitro*. Letras diferentes denotan diferencias significativas respecto al control agua, según rangos múltiples de Tukey (p-valor = 2.2e-16). El inserto representa la comparación entre las medias del control (agua) y medio D fresco estéril (p-valor = 0.031). Barras verticales denotan error estándar; cepas EA-CB0015, EA-CB0305, EA-CB0579, EA-CB0784 y EA-CB0959 (n = 3); cepas EA-CB0070, EA-CB0575, EA-CB0686 y EA-CB1329 (n = 4).

3.3 Selección de agentes controladores de *M. incognita* en invernadero

3.3.1 Nematicidas comerciales

Con el fin de evaluar los nematicidas de origen químico (Rugby®, Verango®), microbiológico (Safelomyces®, Safersoil®) y vegetal (Sincocin®, QL Agri®).de mejor

desempeño a nivel *in vitro*, se llevaron a cabo las pruebas en invernadero en plantas de Sacha inchi y de tomate.

- **Pruebas en Sacha inchi**

Tabla 3-1: Efecto de productos nematicidas sobre la severidad de *M. incognita* en tomate aplicando la dosis recomendada por la casa comercial.

Tratamientos	Dosis de aplicación (1X)	Nodulaciones totales	Huevos / g de raíz[a]	PFA[b] (g)	PFR[c] (g)
Control negativo[d]	--	87 ± [e] 34	4237 ± 2446	37.97 ± 18.71	7.4 ± 3.05
Rugby®	33.3 kg/ha	61 ± 20	6440 ± 3718	3.37 ± 0.62	1.53 ± 0.39
Verango®	0.9 L/ha	11 ± 6	1070 ± 618	20.07 ± 16.32	3.6 ± 2.3
Safelomyces®	0.5 kg/ha	45 ± 34	1525 ± 880	31.57 ± 19.64	7.83 ± 3.98
Safersoil®	0.5 kg/ha	33 ± 14	3863 ± 2230	3.68 ± 0.74	1.33 ± 0.68
QL Agri®	25 L/ha	44 ± 4	3681 ± 1840	3.5 ± 0.41	1.63 ± 0.68
Sincocin®	1.5 L/ha	46 ± 13	532 ± 266	4.2 ± 1.19	1.63 ± 0.49
	p-valor	0.3	0.2	0.7	0.09

[a] g frescos de raíz
[b] Peso fresco aéreo
[c] Peso fresco de raíz
[d] Agua
[e] Intervalos del error estándar para Control negativo, Rugby®, Verango® (nematicidas químicos), Safelomyces® y Safersoil® (nematicidas biológicos), n = 3; QL Agri® y Sincocin® (extractos vegetales), n = 4.

Para determinar el efecto de diversos productos comerciales sobre el nematodo *M. incognita* en planta, se inocularon semillas de Sacha inchi Katio-2 con huevos del nematodo en dos pruebas en invernadero en tiempos independientes. En ambas experimentaciones no se evidenciaron síntomas de infección del nematodo en los controles no tratados con nematicidas después de 30 d de inoculación. Esto podría sugerir, que la cantidad de inóculo usado (9000 huevos/planta) no fue la adecuada, no obstante, según se reporta en la literatura se han logrado obtener síntomas de la infección con dosis entre 500 y 1500 huevos/planta (Márquez Dávila et al., 2013; Márquez et al., 2007). Por lo anterior, otra hipótesis alterna es que la nueva semilla suministrada proveniente de Santa Rosa de Osos, presentó cierto grado de resistencia a *M. incognita*, y por ende se recomienda evaluar diferentes dosis de aplicación del nematodo y establecer sintomatologías bajo un período prolongado de exposición (6 meses) para diferentes variedades de Sacha inchi usadas en el país. En este sentido, dentro de este proyecto, se

realizaron pruebas en invernadero en plantas de tomate, ya que la reproducibilidad de la infección en esta planta fue exitosa (Figura 3-2 a y b).

- **Pruebas en tomate**

El efecto de los diferentes productos comerciales sobre la severidad de la enfermedad en plantas de tomate después de 30 d de inoculación a la dosis recomendada (1X) se observa en la Tabla 3-1. Ningún producto nematicida aumentó significativamente el peso fresco aéreo y radicular, y tampoco redujo las nodulaciones totales ni la cantidad de huevos/g de raíz, siendo los niveles de infección similares con el control negativo.

En general se alcanzaron pesos frescos aéreo entre 3.7 y 37 g y peso fresco de raíz entre 1.53 y 7.83 g; 11 y 87 nódulos por tratamiento y entre 532 y 6440 huevos / g raíz. Por ende, debido a la alta variabilidad obtenida se aumentó el número de réplicas por tratamiento y la dosis de los nematicidas para realizar un segundo experimento.

Para el segundo experimento, la afección causada por *M. incognita* en plantas de tomate se redujo significativamente al aplicar el doble de la dosis de los nematicidas (
Tabla 3-2). En el caso de las nodulaciones y los huevos / g de raíz, los nematicidas químicos Rugby® y Verango® redujeron ambas variables en promedio un 90%; para los nematicidas biológicos Safelomyces® y Safersoil®, se tuvieron reducciones entre un 69 y 88% y los extractos vegetales QL Agri® y Sincocin®, redujeron ambas variables entre 71 y 88%.

Las plantas que fueron evaluadas con aplicación de los nematicidas en este experimento, mostraron algunos síntomas como hojas cloróticas y defoliación, aunque no tan severos como en las plantas que no fueron tratadas con ningún producto. Cabe aclarar que para el preso fresco de raíz hubo diferencias en el tamaño de la raíz para las plantas tratadas con Rugby® respecto a los demás tratamientos, mostrando un menor peso que el resto de los nematicidas (
Tabla 3-2). Este resultado sugiere que este nematicida de origen químico podría tener un efecto negativo en el crecimiento de la planta y que debería ser revisado en un mayor

tiempo de evaluación, efecto reportado por otros autores (Radwan et al., 2012b; Safdar et al., 2012; Sokhandani, Reza, & Basirnia, 2016).

Tabla 3-2: Efecto de productos nematicidas sobre la severidad de *M. incognita* en tomate aplicando el doble de la dosis recomendada por la casa comercial.

Tratamientos	**Dosis de aplicación (2X)**	**Nodulaciones totales**	**Huevos / g de raíz**	**PFR[a] (g)**
Control negativo[b]	--	72 ± [c] 4 a[d]	3599 ± 576 a	2.02 ± 0.34 a
Rugby®	66.6 kg/ha	4 ± 2 c	339 ± 114 c	0.95 ± 0.24 b
Verango®	1.8 L/ha	10 ± 3 c	306 ± 134 c	1.61 ± 0.12 a
Safelomyces®	1 kg/ha	16 ± 2 b	754 ± 333 bc	1.51 ± 0.16 a
Safersoil®	1 kg/ha	22 ± 5 b	419 ± 135 bc	1.55 ± 0.11 a
QL Agri®	50 L/ha	21 ± 5 b	414 ± 67 bc	1.71 ± 0.14 a
Sincocin®	3 L/ha	18 ± 4 b	701 ± 151 b	1.45 ± 0.08 a
	p- valor	1.3e-06	4.3e-04	0.03

[a] Peso fresco de raíz
[b] Control negativo: agua
[c] Intervalos del error estándar (Control negativo, Safelomyces®, Sincocin® y Verango®, n = 9; QL Agri®, Rugby® y Safersoil®, n = 10)
[d] Letras diferentes entre cada grupo, indica diferencias significativas mediante diferencias de medias por Kruskall-Wallis
Nematicidas químicos: Rugby® y Verango®; nematicidas biológicos Safelomyces® y Safersoil®; nematicidas vegetales: QL Agri® y Sincocin®.

Los resultados en invernadero se pueden comparar con los encontrados a nivel *in vitro*, en donde los productos seleccionados tuvieron efecto en la reducción de la eclosión de huevos y movilidad de juveniles J2 de *M*. *incognita.* Al reducirse la movilidad de los estadios juveniles J2 de *M. incognita*, se esperaría una reducción en la viabilidad de la larva para llegar a las raíces de la planta; esto desencadenaría menos formación de nodulaciones y la vez, menos producción de huevos / g de raíz respecto a un control no tratado. De este modo la interacción con el nematodo sería de forma directa con su ciclo de vida, lo que se vio reflejado en que las plantas tuvieran menos afecciones causadas por el nematodo, disminuyendo tanto las nodulaciones como los como las huevos / g de raíz (
Tabla 3-2).

Los productos nematicidas de origen químico tuvieron los mejores porcentajes de reducción de las afecciones causadas por *M*. *incognita*. Este resultado muestra la capacidad de estos productos de mantener su efecto con solo una aplicación durante los 30 días de evaluación en invernadero. Para los nematicidas de origen biológico y vegetal, el porcentaje de reducción de las nodulaciones y de los huevos / g de raíz respecto a un control no tratado en promedio fue del 78%, comparado con el 90% de los nematicidas químicos. El efecto de los agentes de control biológico y los extractos vegetales se le atribuye ya sea al contacto directo con los nematodos, mediante interacción con las membranas celulares, interrupción del sistema nervioso central e inhibición de diferentes enzimas (Andrés et al., 2012) o a posibles relaciones con la planta y la rizosfera. Estas relaciones se podrían dar de dos tipos para los nematicidas biológicos, ya sea porque los microorganismos que son ingredientes activos de los productos, se establezcan y colonicen la rizosfera, generando así posibles metabolitos inhibidores de la eclosión de huevos y la movilidad de juveniles J2 de *M. incognita*, o que crezcan en suelo y formen estructuras capaces de atrapar a los nematodos y sus diferentes estadios y así, no dejar que eclosionen o lleguen a la planta. Los resultados para pruebas *in vitro* sugieren que ambas estrategias podrían darse para controlar de forma efectiva al nematodo fitopatógeno.

En general, en los resultados de las pruebas en invernadero los nematicidas se dividieron en dos grupos, teniendo en por un lado a los nematicidas de origen químico y por otro los biológicos y extractos vegetales. Esta diferencia podría deberse a la naturaleza de los mismos, debido a que los biopesticidas aunque siendo efectivos y seguros, tienen requerimientos específicos en cuanto a la aplicación, en donde condiciones bióticas y abióticas pueden interferir en su modo de acción (Nasr, 2015).

3.3.2 Sobrenadantes bacterianos

Con el fin de conocer el efecto de los sobrenadantes bacterianos en las afecciones causadas por *M. incognita* en tomate, se evaluaron los nueve SLC bacterianos que habían sido estudiados a nivel *in vitro*. Los sobrenadantes bacterianos mostraron reducciones significativas en las nodulaciones totales para los tratamientos con *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. subtilis* EA-CB0575, *B. amyloliquefaciens* EA-CB1329, *B. gibsonii* EA-CB0579, *B.*

pumilus EA-CB0070 y *PaeniBacillus* sp. EA-CB0305 con relación al control negativo (agua) y al tratamiento con medio de cultivo D al 20% (
Tabla 3-3).

Tabla 3-3: Efecto de sobrenadantes bacterianos en la severidad causada por *M. incognita* en tomate a nivel de invernadero

Tratamientos	**Bacteria**	**Cepa**	**Nodulaciones totales**	**PFA[a] (g)**
Control negativo[b]	---	---	56 ± [c] 6 b[d]	8.5 ± 1.1 bcd
Medio D_{20}[e]	---	---	99 ± 10 a	8.0 ± 1.1 cd
Sobrenadante	*B. altitudinis*	EA-CB0686	52 ± 9 b	10.9 ± 1.4 abc
	B. amyloliquefaciens	EA-CB0959	56 ± 8 b	9.2 ± 0.8 abcd
		EA-CB1329	8 ± 2 d	10.9 ± 0.6 ab
	B. gibsoni	EA-CB0579	17 ± 3 c	10.1 ± 2.3 abcd
	B. megaterium	EA-CB0784	48 ± 5 b	8.4 ± 1.2 bcd
	B. pumilus	EA-CB0070	5 ± 1 d	6.8 ± 0.3 d
	B. subtilis	EA-CB0015	29 ± 1 c	11.3 ± 1.6 abc
		EA-CB0575	18 ± 4 c	12.1 ± 0.6 a
	PaeniBacillus sp.	EA-CB0305	5 ± 2 d	10.9 ± 1.7 abc
		p-valor	3.6e-10	0.03

[a] Peso fresco aéreo
[b] Control negativo: agua
[c] Intervalos del error estándar para Control negativo n = 10; EA-CB0784, EA-CB0070, EA-CB0015 y EA-CB0305, n = 7; EA-CB0686, EA-CB0959, EA-CB1329, EA-CB0579 y EA-CB0575 n = 6
[d] Letras diferentes entre cada grupo indican diferencias significativas mediante diferencias de medias por Kruskall-Wallis
[e] Medio D diluido al 20%

Las plantas tratadas con los sobrenadantes bacterianos de *B. pumilus* EA-CB0070, *B. amyloliquefaciens* EA-CB1329 y *PaeniBacillus* sp. EA-CB0305, tuvieron reducciones en las nodulaciones en promedio del 90%, seguidos de los tratamientos con *B. gibsonii* EA-CB0579, *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. subtilis* EA-CB0575, donde se encontró en promedio un 62% menos de nodulaciones respecto al control negativo. Estos resultados sugieren que los sobrenadantes bacterianos contienen metabolitos con efecto nematicida generando una reducción en la severidad generada por *M. incognita*.

Los sobrenadantes bacterianos de las cepas *B. altitudinis* EA-CB0686, *B. megaterium* EA-CB0784 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959, tuvieron un efecto en las pruebas *in vitro* en la reducción de la eclosión de huevos y en la movilidad de juveniles J2 de *M. incognita* (Figura 3-6 y Figura 3-7), pero no para las pruebas bajo condiciones de invernadero, en donde no hubo un efecto respecto al control negativo, lo que sugiere que posiblemente los metabolitos presentes en el sobrenadante sean degradados por otros microorganismos en el suelo, o no contengan la concentración requerida para generar un efecto significativo en el sistema evaluado. En este sentido, se debe tener en cuenta que muchas veces los productos biológicos tienen como característica que son susceptibles a variables bióticas y abióticas que pueden contrarrestar el efecto que tienen.

Los resultados para los diferentes controles que se tuvieron en el experimento, mostraron como las plantas tratadas con el medio D al 20% tuvieron más nodulaciones que las del control negativo. Este resultado se relaciona con el encontrado en forma *in vitro*, en donde el medio D promovía la eclosión de huevos y la movilidad de juveniles J2 de *M. incognita*, de este modo las larvas en suelo pudieron haber estado más activas e ingresaron en un menor tiempo a la raíz. Del mismo modo al haber producción de huevos, éstos pudieron haber eclosionado más rápidamente y empezar de nuevo con el ciclo biológico. Este resultado sugiere que probablemente los componentes del medio estarían teniendo una promoción de la viabilidad del nematodo; este resultado confirma la capacidad de los sobrenadantes bacterianos de generar un efecto antagónico hacia *M. incognita*, debido a que sin importar la acción del medio D remanente en las fermentaciones, los metabolitos presentes en los sobrenadantes pudieron disminuir las afecciones causadas por el nematodo fitopatógeno.

Los resultados para el PFA de las plantas evaluadas, mostraron que el sobrenadante de la cepa *B. subtilis* EA-CB0575, tuvo diferencias significativas respecto al control negativo y al tratamiento con medio D al 20%, mostrando un aumento en el peso de las plantas cuando se inoculó el sobrenadante bacteriano. Las plantas tratadas con los sobrenadantes de las cepas *B. megaterium* EA-CB0784 y *B. pumilus* EA-CB0070, tuvieron los menores pesos frescos aéreos, con valores similares al control negativo.

3.4 Caracterización fisicoquímica de los SLC

A partir de los resultados encontrados en las evaluaciones *in vitro* (3.2.2) y en invernadero (3.3.2), en donde los SLC y sobrenadantes bacterianos de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015, *B. pumilus* EA-CB0070 y *B. gibsonii* EA-CB0579 afectaron la viabilidad de los diferentes estadios evaluados así como las nodulaciones en plantas de tomate, se determinó la estabilidad de la actividad nematicida de estos SLC a tratamientos con diferentes pH y temperaturas, así como a la adición de proteinasa K.

Tabla 3-4: Efecto de la temperatura en la actividad nematicida de los SLC sobre la eclosión de huevos de *M. incognita*

Tratamiento	**% Eclosión**			
	$SLC_{control}$[b]	$SLC_{temperatura}$ (°C)[c]		
		50	70	100
B. subtilis EA-CB0015	7.5 ± 1.7	6.5 ± 1.5	10.0 ± 1.4	9.0 ± 1.9
B. pumilus EA-CB0070	7.0 ± 2.4	4.0 ± 0.8	6.0 ± 2.4	5.0 ± 1.7
B. gibsonii EA-CB0579	5.0 ± 1.3 ab	5.0 ± 1.3 ab	9.5 ± 1.7 a	3.5 ± 1.0 b
Control negativo[a]	34.3 ±[d]2.8[*]			

[a] Control negativo: agua
[b] $SLC_{control}$: SLC no expuestos a temperatura
[c] $SLC_{temperatura}$: SLC expuestos a diferentes temperaturas
[d] Intervalos del error estándar, n = 4
* Denota diferencias significativas entre las medias del control negativo y los $SLC_{temperatura}$ (p- valor = 8.1e-06).
Letras diferentes denotan diferencias significativas según rangos múltiples de Tukey para: $SLC_{control}$ y SLC_{pH} de *B. gibsonii* EA-CB0579 (p- valor: 0.0482). Las demás comparaciones, no arrojaron diferencias significativas (p- valor: 0.4731 *B. subtilis* EA-CB0015, 0.7321 *B. pumilus* EA-CB0070).

La capacidad de los SLC bacterianos de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. pumilus* EA-CB0070 para disminuir la eclosión de huevos de *M. incognita*, no fue afectada por las diferentes temperaturas (Tabla 3-4), lo que sugiere que la actividad nematicida no es de carácter proteico. En el caso del SLC de la cepa *B. gibsonii* EA-CB0579, el efecto en la eclosión de huevos de *M. incognita* fue levemente significativo, en donde a 50°C se perdió parte de la actividad, pero a 100°C se aumentó. Estos resultados sugieren que los

metabolitos del SLC de esta cepa podrían afectarse por tratamientos específicos a estas temperaturas y perder posiblemente su actividad.

Para el caso del tratamiento de los SLC a diferentes pH (Tabla 3-5), no se evidenció un efecto al someter los SLC a pH 2, pues todos conservaron su actividad nematicida. En el tratamiento a pH 10, el SLC bacteriano de la cepa *B. gibsonii* EA-CB0579 inhibió de igual forma la eclosión de huevos de *M. incognita* que el SLC sin tratar, caso contrario con los SLC de *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. pumilus* EA-CB0070, para los cuales la actividad nematicida disminuyó en aproximadamente un 100% respecto al SLC sin tratar. Este resultado sugiere que los metabolitos con efecto nematicida para estas dos cepas, podrían degradarse y por ende perder su actividad en pH alcalinos más no a pH ácidos.

Tabla 3-5: Efecto del pH en la actividad nematicida de los SLC sobre la eclosión de huevos de *M. incognita*

Tratamiento	**% Eclosión**		
	$SLC_{control}$[b]	SLC_{pH}[c]	
		2	10
B. subtilis EA-CB0015	6.5 ± 1.7 b	3.0 ± 1.0 b	14.0 ± 2.4 a
B. pumilus EA-CB0070	5.5 ± 1.3 b	7.0 ± 1.3 ab	13.5 ± 2.9 a
B. gibsonii EA-CB0579	3.3 ± 1.3 ab	0.7 ± 0.7 b	8.0 ± 2.0 a
Control negativo[a]	39.5 ±[d] 2.6*		

[a] Control negativo: agua
[b] $SLC_{control}$: SLC sin tratamiento a diferentes pH
[c] SLC_{pH}: SLC expuestos a diferentes temperaturas
[d] Intervalos del error estándar, n = 4
* Denota diferencias significativas entre las medias del control negativo y los $SLC_{control}$ (p- valor =7.4e-06).
Letras diferentes denotan diferencias significativas según rangos múltiples de Tukey para $SLC_{control}$ y SLC_{pH} entre cada cepa bacteriana (p- valor = 0.006 *B. subtilis* EA-CB0015, 0.0345 *B. pumilus* EA-CB0070 y 0.0301 *B. gibsonii* EA-CB0579).

Tabla 3-6: Efecto de la proteinasa K en la actividad nematicida de los SLC sobre la eclosión de huevos de *M. incognita*

Tratamiento	**% Eclosión**	
	$SLC_{control}$[b]	SLC_{p}[c]
B. subtilis EA-CB0015	29.5 ± 4.3	23.4 ± 3.6
B. pumilus EA-CB0070	21.6 ± 2.0	14.4 ± 1.0

B. gibsonii EA-CB0579	21.9 ± 2.2	26.7 ± 3.5
Control negativo[a]	79.8 ±[d] 1.7*	

[a] Control negativo: agua
[b] $SLC_{control}$: SLC sin tratamiento a proteinasa
[c] SLC_p: SLC tratados con proteinasa
[d] Intervalos del error estándar, n = 4
* Denota diferencias significativas entre las medias del control negativo y los $SLC_{control}$ (p- valor = 7.4e-08).
Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las medias de $SLC_{control}$ y SLC_p entre cada cepa bacteriana (p-valor = 0.3145*B. subtilis* EA-CB0015, 0.0628 *B. pumilus* EA-CB0070 y 0.3003 *B. gibsonii* EA-CB0579).

Al analizar los resultados para la prueba con proteinasa (Tabla 3-6), todos los SLC mantuvieron su actividad en la reducción de la eclosión de huevos de *M. incognita*, resultado que se complementa con el de estabilidad al tratamiento con diferentes temperaturas (Tabla 3-4), reafirmando la sugerencia de que los metabolitos activos no son de carácter proteico.

3.5 Prueba *in vitro* con fracciones SPE

Con el fin de purificar los metabolitos activos de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. gibsonii* EA-CB0579, se realizaron extracciones en fase sólida de los SLC y se recuperaron tres fracciones (F1, F2 y F3), para las cuales se determinó la actividad nematicida sobre huevos de *M. incognita*.

Los resultados para la prueba con las fracciones SPE recuperadas se muestran en la Figura 3-8, en donde los SLC de las cepas bacterianas mantuvieron su efecto en la reducción de la eclosión, respecto al control agua, con porcentajes de reducción en promedio del 67%. La solución buffer y el medio D_{20} utilizadas como controles, tuvieron un efecto en la diminución de la eclosión de huevos de *M. incognita*, con un porcentaje de reducción de la eclosión en promedio del 23%, respecto al control agua. Este resultado sugiere que los huevos podrían estar teniendo una inhibición en estas soluciones. Cabe resaltar que al analizar los controles y los SLC de ambas cepas bacterianas, estos últimos continuaron teniendo diferencias respecto a los controles (Anexo 1). Por lo anterior, sigue siendo

predominante el efecto nematicida de los SLC sobre la eclosión de los huevos de *M. incognita*.

Las fracciones F2 y F3 de los SLC de cada cepa tuvieron un efecto en la reducción de la eclosión de huevos de *M. incognita* similar al SLC sin fraccionar, con porcentajes de reducción de la eclosión respecto al control agua de aproximadamente el 57% para las F2 y F3 de la cepa *B. subtilis* EA-CB0015 y 62% para las mismas fracciones de la cepa *B. gibsonii* EA-CB0579. Al lograr actividad nematicida en estas fracciones, se puede sugerir que los metabolitos pueden tener un carácter más apolar, pues tuvieron más afinidad por los solventes MetOh 50 y 100% por medio de los cuales fueron recuperados.

Estos resultados permitieron dilucidar las fracciones que podrían tener los metabolitos nematicidas para poder separar los componentes de las mismas y así continuar con la evaluación de la actividad nematicida.

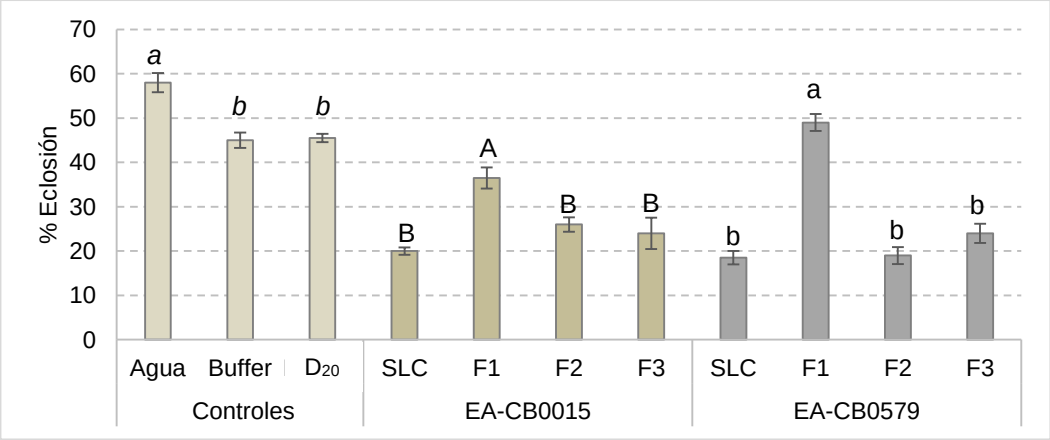


Figura 3-8: Efecto de las fracciones recuperadas mediante SPE de SLC de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. gibsonii* EA-CB0579 en la actividad nematicida sobre huevos de *M. incognita*. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los controles (p-valor = 0.0002) y respecto al SLC sin fraccionar (letras mayúsculas para EA-CB0015; letras minúsculas para EA-CB0579), según rangos múltiples de Tukey (p-valor EA-CB0015 = 0.002 y p-valor EA-CB0579 = 1.92e-07). F1, corresponde a la fracción agua, F2 a la fracción 50% MetOH y F3 a 100% MeOH. Barras verticales denotan error estándar (n = 4).

3.6 Efecto de diferentes lipopéptidos de *B. subtilis* EA-CB0015 en la eclosión de huevos de *M. incognita*

Para determinar la capacidad nematicida de los componentes de la F3 recuperada del SLC de *B. subtilis* EA-CB0015, se realizó la purificación por RP-HPLC de los lipopéptidos producidos por esta cepa bacteriana, de acuerdo a caracterizaciones previas realizadas por Villegas-Escobar et al. (2013).

Tabla 3-7: Efecto de los lipopéptidos de *B. subtilis* EA-CB0015 en la eclosión de huevos de *M. incognita* a nivel *in vitro*.

		% Eclosión	
Concentración		1X	2X
Controles	Agua	37.6 ± [a] 1.9	
	SPE	20.1 ± 1.8* a[b]	21.5 ± 1.4* a
Lipopéptidos	Fen	23.8 ± 1.3 a	21.7 ± 2.6 a
	Itu	23.5 ± 2.2 a	26.6 ± 2.2 a
	Sur	17.5 ± 1.8 a	18.5 ± 3.5 a

[a] Intervalos del error estándar, SPE 2X, Itu 1X, n =16; Fen 1X, Sur 1X, Itu 1X, Sur 2X, n= 17; SPE 1X, n=18; Agua, Fen 2X n= 20

* Denotan diferencias significativas entre las medias del control agua con SPE 1X (p- valor = 4.031e-08) y con SPE 2X (p- valor = 4.043e-08).

[b] Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los diferentes lipopéptidos y SPE según rangos múltiples de Tukey para concentración 1X (p- valor = 0.0469) y según diferencias de medias por Kruskall-Wallis para concentración 2X (p- valor = 0.1229).

Los resultados que se muestran en la
Tabla 3-7, indican que no existen diferencias entre los lipopéptidos Fen, Itu y Sur, cuando son evaluados a la concentración 1X o 2X, respecto al tratamiento SPE a la misma concentración.

Los tratamientos SPE en ambas concentraciones (1X y 2X), redujeron aproximadamente un 45% la eclosión de huevos de *M. incognita* respecto al control agua, lo que sugiere que la fracción seleccionada para la extracción de los lipopéptidos mantenía un efecto

nematicida significativo. Cabe resaltar que este porcentaje es menor al encontrado anteriormente al evaluar la F3, la cual es equivalente al tratamiento SPE, en donde se obtuvo un porcentaje de reducción de la eclosión del 57% aproximadamente (sección 3.5). Este resultado sugiere que procedimiento realizado, podría estar afectando ya sea los componentes o las concentraciones de los metabolitos presentes en la fracción F3.

Al evaluar de manera independiente los lipopéptidos a la concentración 1X, no hubo diferencias entre la fracción SPE y cada lipopéptido. En este sentido, se decidió realizar la prueba a una doble concentración (Itu a 710 ppm, Fen a 1504 ppm y Sur a 604 ppm), para la cual el efecto de la fracción SPE se mantuvo y se evidenció que los tres lipopéptidos por separado tenían un efecto similar a la SPE y con porcentajes de inhibición de la eclosión del 42% para Fen, 29% para Itu y 50% para Sur, respecto al control no tratado. Cabe destacar que las surfactinas tuvieron poca solubilidad en el buffer fosfato que se utilizó para la prueba (sección 1.1.1) ya que se veía un precipitado en el tubo donde se realizó la suspensión de los lipopéptidos. En este sentido, este factor pudo influenciar en la evaluación de las surfactinas y no mostrar posibles diferencias al ser evaluadas solas o en solución con los otros lipopéptidos (fracción SPE). Adicionalmente, los resultados sugieren que al no existir diferencias entre los lipopéptidos evaluados de forma individual comparados con la fracción SPE, en donde se encuentran las tres familias en suspensión, que no existe un efecto sinérgico entre los lipopéptidos.

4. Discusión

Meloidogyne spp. son organismos causales de enfermedades en cultivos de interés agrícola a nivel mundial. Controlar este patógeno de forma efectiva ha sido materia de estudio, con estrategias que incluyen el uso de productos agrícolas nematicidas o microorganismos y sus metabolitos capaces de antagonizar este patógeno de forma *in vitro* y en planta. En la presente investigación las evaluaciones *in vitro* de los productos nematicidas evaluados así como los SLC bacterianos, arrojaron reducciones de la eclosión de huevos y de la movilidad de juveniles J2 de *M. incognita*. Dados estos resultados y pasando a evaluación en planta bajo condiciones de invernadero, se obtuvo respuesta positiva en cuanto a la reducción de la afectación causada por el nematodo fitopatógeno. Partiendo de estos resultados prometedores para los cepas bacterianas evaluadas, se seleccionaron tres SLC para caracterización fisicoquímica, la cual permitió conocer la estabilidad a cambios de temperatura, pH y acción enzimática de los productos de fermentación de las cepas *B. pumilus* EA-CB0070, *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. gibsonii* EA-CB0579 en la actividad nematicida. A partir de estos resultados, se seleccionaron los SLC de las cepas EA-CB0015 y EA-CB0579 para hacer purificación parcial y caracterización por RP-HPLC, en donde se pudo observar la capacidad de ciertos metabolitos presentes en los productos de fermentación de la cepa *B. subtilis* EA-CB0015 capaces de inhibir el

ciclo de vida de *M. incognita*, ayudando así a esclarecer la posible forma de acción de los SLC en la inhibición del ciclo de vida del nematodo fitopatógeno.

La caracterización de las cepas de *Meloidogyne* sp. presentes en las plantas de tomate luego del aislamiento, permitió verificar que pertenecían a la especie *M. incognita* (3.1). Para el caso de tomate, a la especie M. *incognita* se reporta como una de las especies que más afecta los cultivos de tomate, teniendo incidencia en pérdidas de productividad entre el 22 – 30 % (Seid, Fininsa, Mekete, Decraemer, & Wesemael, 2015).

De los nematicidas químicos evaluados, Rugby® y su molécula activa (Cadusafos), ha sido reportada para el control de *Meloidogyne* spp. y otros nematodos fitopatógenos (Safdar et al., 2012), tanto para estadios huevo y larva en ensayos *in vitro* como para evaluaciones bajo condiciones de invernadero. La capacidad de este nematicida de intervenir en el ciclo de vida del nematodo, implica la inhibición de la enzima A-ChE, dejando consecuencias en el sistema nervioso central, sea por contacto directo o por ingestión en el caso de los juveniles J2 (Radwan et al., 2012b), razón por la cual posiblemente en los resultados para la reducción de la eclosión (Figura 3-4) y movilidad de juveniles J2 (Figura 3-5), hubo un efecto significativo respecto al control, para ambos ensayos con este nematicida. Para el caso de Verango®, se reporta que este compuesto y su molécula activa (Fluopyram) interactúan con enzimas presentes en la respiración celular, específicamente la succinato deshidrogenasa, inhibiendo su actividad y causando alteraciones en el metabolismo del microorganismo (Faske & Hurd, 2015). Por su parte, los ingredientes activos de Larvin®

Tabla 2-1) se han evaluado previamente en estadios juveniles J2 de *M. incognita* (Gonçalves Borges, Kuhn Odair, Battistus, Lopez Estevez, & Coltro, 2013), obteniendo un efecto mayor en la mortalidad de los juveniles J2, pero sin evaluaciones sobre huevos, en contraposición al presente estudio, lo que podría ayudar a ampliar el conocimiento que se tiene de los diferentes estadios que son susceptibles a la acción con este nematicida.

A partir de estos resultados, los productos Rugby® y Verango® fueron evaluados bajo condiciones de invernadero, en donde ambos tuvieron efecto en la reducción de las afecciones causadas por *M. incognita* (
Tabla 3-2). Safdar y colaboradores (2012), encontraron luego de 60 d de evaluación curativa de Cadusafos (Rugby®) reducciones en las nodulaciones en tomate, aunque el

efecto fue mejor cuando se utilizaba el producto de forma preventiva (Safdar et al., 2012). En el presente estudio, Rugby® y Verango® tuvieron los mejores efectos sobre la reducción en las nodulaciones y los huevos/g de raíz, posicionándolos como nematicidas químicos efectivos a la hora de controlar *M. incognita*. Cabe resaltar que el uso de Rugby® debe ser revisado, ya que se obtuvo el menor peso radicular en las plantas tratadas con este nematicida, lo que podría acarrear problemas en el desarrollo de la planta. Radwan et al. (2012b), encontraron que los tratamientos con cadusafos (Rugby®), controlaron las afectaciones causadas por *M. incognita* pero redujeron el peso radicular de plantas de tomate en un 41%. Estos resultados sugieren una posible toxicidad por parte de la molécula activa del nematicida en el sistema radicular.

Para el caso de Verango® y su molécula activa Fluopyram, los reportes para el control de nematodos son recientes (Faske & Hurd, 2015). Los autores proponen un modelo de evaluación en juveniles J2, en donde a las 24 h de exposición, la molécula activa tiene efecto en la movilidad del estadio, no obstante, no se reportaron evidencias de su efecto sobre estadio huevos, como se hizo en el presente trabajo. Los resultados obtenidos para este nematicida de origen químico muestran como hubo efecto en ambos estadios evaluados y sugieren que el mecanismo de acción está posiblemente ligado moléculas presentes en ambos estadios del ciclo de vida del nematodo.

En el caso de los nematicidas con base en extractos vegetales se encuentra que Eco A-Z®, el cual tiene como ingrediente activo extracto de ajo (Tabla 2-2), ha sido reportado como nematicida en estudios en planta y con varias aplicaciones sucesivas (Shin et al., 2005; W. El-Nagdi & Youssef, 2013). En las pruebas *in vitro*, este nematicida tuvo mayor porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos que de la movilidad de juveniles J2 de *M. incognita,* al utilizarse una concentración de 0.1% v/v del nematicida. Agbenin y colaboradores (2005), encontraron que en evaluaciones en masas de huevos *in vitro* a una concentración de extracto de ajo del 20% p/v, no hubo eclosión de huevos desde masas de huevos (Agbenin, Emechebe, Marley, & Akpa, 2005), reporte que apoya el resultado encontrado en el presente trabajo.

En el caso del extracto a base de quillay (*Quillaja saponaria*), componente activo de QL Agri®, Giannakou en el 2011 reportó inmovilidad para estadios juveniles J2 en

Meloidogyne spp. del 25% después de 4 d de tratamiento y superior al 80% después de 8 d de exposición al producto. En el presente trabajo, al cabo de 2 d, se obtuvo un 20% de reducción en la movilidad de juveniles J2, respecto al control (Figura 3-5), lo que sugiere que el efecto podría llegar a ser mayor si se evaluara en más tiempo. A este producto se le atribuye la acción nematicida a las saponinas triterpenoides presentes en su extracto, las cuales interactúan con las membranas biológicas hasta volverlas fluidas (Guo & Kenne, 2000), permitiendo daño en las mismas e interrupción del ciclo de vida o normal funcionamiento del nematodo (San Martín & Magunacelaya, 2005). Adicionalmente QL Agri® se ha reportado como efectivo en la disminución de poblaciones de juveniles J2 en suelo, al ser aplicado en tres tiempos diferentes durante 20 d de evaluación en plantas de tomate (Giannakou, 2011). Este efecto se ve relacionado tanto con la capacidad de interactuar directamente con los nematodos, así como de crear efecto antitróficos en los juveniles J2, desorientándolos posiblemente de la raíz y evitando que ingresen en la planta.

La capacidad de Sincocin® de causar inmovilidad en estadios móviles de nematodos fitopatógenos, ha sido evaluada anteriormente para *Pratylenchus penetrans* (Pinkerton & Kitner, 2006), en donde este nematicida no tuvo diferencias respecto a un control no tratado. En el presente trabajo, Sincocin® tuvo efecto reduciendo la eclosión de huevos pero no de juveniles J2 de *M. incognita*, lo que sugiere la posible especificidad del producto en controlar a algunos de los estadios del nematodo. Este nematicida está compuesto de ácidos grasos naturales como ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, para los cuales se ha reportado que pueden tener acción repelente desde la planta hacia los nematodos, previniendo el ataque del parásito (Andrés et al., 2012; Zhang, Ruan, Deng, & Gao, 2012; Ghazalbash & Abdollahi, 2013). En el presente trabajo, Sincocin® fue efectivo a la hora de reducir la eclosión de huevos de *M. incognita*, pero no tuvo un efecto significativo en la reducción de la movilidad de juveniles J2 respecto al control no tratado. No obstante, la evaluación en planta de este nematicida, mostró reducciones tanto en las nodulaciones como en los huevos/g de raíz (
Tabla 3-2), indicando que la efectividad de este producto mejoró en las pruebas en planta en comparación con las pruebas *in vitro*. Sincocin® ha sido estudiado previamente en evaluaciones bajo condiciones de invernadero como agente controlador de *Meloidogyne* spp.; existen reportes en los que el nematicida disminuye el número de agallas en raíces

de tomate, en donde se sugiere que el efecto de este extracto vegetal se da no por el contacto directo con los nematodos, sino con las raíces de la planta y los exudados radicualres (El-Nagdi & Youssef, 2013): Estos extractos vegetales comúnmente contienen moléculas de glucósidos, los cuales pueden ser hidrolizados hasta compuestos fenólicos y estos terminar siendo tóxicos para los nematodos (El-Nagdi & Youssef, 2004; Osman *et al*., 2005).

Los nematicidas de origen biológico (Tabla 2-1) y sus ingredientes activos, se han utilizado por tener la capacidad de parasitar estadios como huevos y J2 (Radwan et al., 2012a). De igual forma, la producción de quitinasas y serin proteasas por parte de *Purpureocillium* spp., así como la formación de apresorios, ha sido reportada como los posibles modos de control de nematodos fitopatógenos por parte de este microorganismo (Kiewnick, Neumann, Sikora, & Frey, 2011). Para *Trichoderma* spp., Sharon y colaboradores reportan que la capacidad *in vitro* de este hongo en parasitar los huevos y los juveniles J2, está dada por una interacción muy cercana entre residuos de carbohidratos de la matriz gelatinosa en la que deposita la hembra los huevos y el hongo (Sharon et al., 2009). De ese modo, los resultados para los productos evaluados de forma *in vitro*, están asociados con la capacidad de los microorganismos presentes es las formulaciones de interactuar con *M. incognita*, ya sea por competencia activa, mediante la producción de enzimas que atacan específicamente el microorganismo, o de forma pasiva, mediante la colonización del espacio.

Estos resultados se comparan con los encontrados en las evaluaciones en planta, donde los nematicidas de origen biológico (Tabla 2-1) tuvieron efecto en la reducción de las nodulaciones y los huevos/g raíz respecto al control no tratado con nematicidas. Este comportamiento ha sido reportado para *Trichoderma* spp. y *Purpureocillium* spp., ingredientes activos de ambos productos (Khan, Haque, & Kausar, 2014; Affokpon et al., 2011; Anastasiadis, Giannakou, Prophetou-Athanasiadou, & Gowen, 2008). Radwan y colaboradores (2012a), encontraron reducciones del 63% en el número de agallas en plantas de tomate después de 50 DDI del nematodo, al ser tratadas con un producto nematicida con *T. álbum* como ingrediente activo a una dosis de 5 g/Kg de suelo. Este resultado es comparable con los obtenidos en las evaluaciones realizadas en el presente trabajo, en donde Safersoil®, con los hongos *T. asparellum*, *T. atriviride*, *T. harzianum*, y

P. lilacinus, *Trichoderma* sp. y *P. lilacinus* como agentes biocontroladores, propició un porcentaje de reducción del número de agallas del 69% respecto a un control no tratado, con una dosis de aplicación de 0.88 mg/kg de suelo. Del mismo modo, se le atribuye a *Trichoderma* spp. la capacidad de producir metabolitos secundarios en suelo capaces de interactuar directamente con la planta o con el nematodo fitopatógeno, ocasionando daños celulares (Sahebani & Hadavi, 2008).

Como se ha mostrado, los nematicidas que exhibieron un buen desempeño en las pruebas *in vitro*, tuvieron también reducciones en las afectaciones causadas por *M. incognita* en plantas de tomate. Para el caso de Sincocin®, las evaluaciones contra juveniles J2 de forma *in vitro*, mostraron que el producto no tuvo diferencias respecto al control no tratado, pero redujo las nodulaciones en planta en un 88%. En este sentido, se hace importante resaltar que la selección de nematicidas puede estar determinada por pruebas que tengan en cuenta el sistema suelo-planta y no ser descartados desde una fase exploratoria *in vitro*. Por otra parte, al realizar las evaluaciones de las cepas de BAFEs de forma *in vitro* (SLC) y en invernadero (sobrenadantes bacterianos), todas las cepas tuvieron un efecto significativo tanto en la reducción de la eclosión de huevos (Figura 3-6) y movilidad de juveniles J2 de *M. incognita* (Figura 3-7), como en las nodulaciones en planta que puede producir este nematodo (
Tabla 3-3). Las evaluaciones se realizaron con los productos de fermentación de los microorganismos y no inoculando directamente las bacterias, por lo que se sugiere que las cepas bacterianas producen metabolitos en cultivo sumergido que repercuten en el ciclo de vida del nematodo.

Las bacterias y sus productos de fermentación evaluadas en el presente trabajo, han sido reportadas previamente como controladoras de *Meloidogyne* spp. Es así como Woo-Jin et al. (2002), reportan que en una fermentación líquida de *PaeniBacillus illinoisensis* inoculada con huevos de *M. incognita*, se obtuvo un porcentaje de eclosión de huevos del 2.5%, transcurridas 48 h de crecimiento de la bacteria. Durante el mismo tiempo pero para el SLC de *Paenibacillus* sp. EA-CB0305, los huevos tuvieron un porcentaje de eclosión de 1.5%, lo que sugiere que la inhibición de la eclosión puede estar sujeta a los metabolitos que produce el microorganismo en el medio de cultivo. Para el caso de *B. pumilus*, Lee y

Kim (2015) encontraron que luego de 5 d de fermentación de esta bacteria, a una concentración del 10% v/v del medio que contenía tanto células como sobrenadante, obtuvieron una reducción en la eclosión de huevos de *M. arenaria* del 88.3% y de muerte de juveniles J2 del 92.8% después de 3 d de exposición. En este sentido, la cepa *B. pumilus* EA-CB0070 tuvo un efecto comparable, obteniendo en promedio un 94% de reducción de la eclosión y de la movilidad de juveniles J2 (Figura 3-6 y Figura 3-7) después de 48 h de evaluación. Asimismo, otros autores reportan como el extracto libre de células de *B. megaterium*, redujo a nivel *in vitro* la eclosión de huevos y movilidad de juveniles J2 de *M. incognita* en promedio un 40%, luego de 48 h de incubación (Saikia, Tiwari, & Pandey, 2013). La cepa *B. megaterium* EA-CB0784 utilizada en el presente trabajo, obtuvo en promedio un porcentaje de reducción de la eclosión de huevos y de movilidad de juveniles J2 del mismo nematodo del 90%.

La acción nematicida de estos microorganismos sobre la eclosión de huevos y la movilidad de juveniles J2 de especies de *Meloidogyne*, se le atribuye a diferentes factores. En este sentido, se reporta para *Bacillus* spp. la producción de enzimas proteolíticas, quitinolíticas y glucanasas, las cuales intervienen directamente en la membrana del nematodo destruyéndola o vacuolándola (Perry et al., 2009). Igualmente, se reporta otras moléculas como algunos lipopéptidos cíclicos, los cuales tienen la capacidad de degradar la membrana del nematodo o intercalarse en la misma, interfiriendo en su estructura y función (Kavitha et al., 2012; Zhao et al., 2018). También, se ha evidenciado que el efecto nematicida de *B. megaterium* por ejemplo, la producción de compuestos volátiles como decanal, 2-nonanon y benzaldehído bajo condiciones *in vitro* (Huang et al., 2010), los cuales pueden ser tóxicos para los nematodos fitopatógenos.

En el caso de *B. gibsonii*, desde nuestro conocimiento no se tienen reportes de esta bacteria en evaluaciones con nematodos fitopatógenos. Este microorganismo se reporta como productora de proteasas alcalinas (Martinez et al., 2013; Deng et al., 2014), las cuales podrían ejercer una efecto nematicida en *M. incognita*, ya que podría interactuar con las proteínas de membrana del nematodo.

La capacidad de las cepas bacterianas para producir estos compuestos, va a depender del medio de cultivo, las condiciones de crecimiento y la variabilidad entre cepas de la misma

especie para la síntesis de las moléculas (Raaijmakers, de Bruijn, Nybroe, & Ongena, 2010¸ Abdel-Salam, Ameen, Soliman, Elkelany, & Asar, 2018). Cabe resaltar que el medio de cultivo utilizado para la obtención de los SLC en el presente trabajo, es un medio que se ha reportado para aumentar las concentraciones de biomasa y de lipopéptidos para una cepa *B. subtilis* (Mosquera et al., 2014).

Como se detalla anteriormente, las cepas utilizadas en el presente estudio tuvieron un desempeño eficiente a la hora de reducir la eclosión de huevos como la movilidad de juveniles J2 de *M. incognita*. La erradicación de este nematodo de suelos agrícolas es casi imposible, debido a la capacidad polífaga de este microorganismo, pero la inhibición de la eclosión de huevos o movilidad de juveniles J2 de *Meloidogyne* spp., es de gran ayuda a la hora de reducir las poblaciones de este nematodo en raíces y suelos (Saikia et al., 2013).

Es así como en las evaluaciones en plantas de tomate (
Tabla 3-3), la mayoría de los sobrenadantes tuvieron efecto en la reducción de las nodulaciones provocadas por *M. incognita*, excepto las cepas *B. altitudinis* EA-CB0686, *B. megaterium* EA-CB0784 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959. Este resultado sugiere que la interacción de los SLC de las
bacterias y el sistema suelo-planta, podría estar dejando como consecuencia la degradación de estos componentes o que las concentraciones no son las requeridas para poder ver el efecto en plantas.

La capacidad de estas bacterias para inhibir las afecciones causadas por *Meloidogyne* spp. ha sido reportada previamente. Almaghrabi y colaboradores (2013), encontraron que, luego de utilizar tanto las células como el producto de fermentación de *B. subtilis* para sumergir las raíces de tomate, este redujo las nodulaciones en un 33% luego de 45 d de evaluación; para las cepas EA-CB0015 y EA-CB0575 la reducción fue del 49% y 67%, respectivamente, utilizando solamente el SLC de cada cepas, demostrando la capacidad del SLC de *B. subtilis* como agente biocontrolador de *Meloidogyne* spp. (Xia et al., 2011; Zhao et al., 2018).

El control de poblaciones de nematodos fitopatógenos por parte de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, dentro de las cuales se encuentran especies del género *Bacillus*, envuelve mecanismos como la producción de antibióticos, enzimas, parasitismo o la inducción de resistencia sistémica en las plantas (Jamal et al., 2017). Los extractos o sobrenadantes microbianos, contienen a menudo compuestos fenólicos, metabolitos secundarios y ácidos orgánicos, para los cuales se ha demostrado que tienen actividad nematicida en estudios en planta (Saikia et al., 2013) o que pueden ser elicitores de la resistencia sistémica inducida (Ongena et al., 2007).

A partir de los resultados encontrados y con el fin de purificar los metabolitos implicados en el control de *M. incognita*, se llevó a cabo la caracterización de los SLC de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015, *B. pumilus* EA-CB0070 y *B. gibsonii* EA-CB0579. Esta caracterización comprendió la estabilidad de la actividad nematicida a cambios de pH, temperatura y acción enzimática por proteasas. En este sentido, en el tratamiento a pH 10 los SLC de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. pumilus* EA-CB0070 redujeron su capacidad de inhibir la eclosión de huevos de *M. incognita*, respecto al SLC no tratado. Para el caso de especies del género *Bacillus*, se reporta la capacidad de producir proteasas alcalinas y algunos péptidos de síntesis ribosomal con actividad óptima entre pH 7 – 10 (Schallmey, Singh, & Ward, 2004.), pero en el caso de los lipopéptidos, algunos pueden cambiar propiedades como la tensión superficial con el incremento del pH y podrían precipitarse (Kim et al., 1997; Nitschke & Pastore, 2006), lo que podría influenciar la pérdida de ciertas características, por ejemplo, la actividad nematicida.

Para la cepa *B gibsonii* EA-CB0579, no hubo diferencias significativas en ninguno de los dos pH evaluados, respecto al SLC sin tratar (pH inicial). Para el tratamientos a pH 10 se puede sugerir que se mantiene la actividad debido a que se reporta que este microorganismo metaboliza proteasas alcalinas y que de este modo podría tener otros metabolitos con esta característica química (Deng et al., 2014). Adicionalmente, se reporta que para otras especies del género *Bacillus*, existen actividades enzimáticas máximas a pH de 10.5 (Beg, Q.K., Gupta, 2003), lo cual podría asociarse con los resultados encontrados para *B. gibsonii.*

Los tratamientos a diferentes temperaturas, así como con proteinasa K, no mostraron efecto en los SLC de las cepas seleccionadas para caracterización y por lo tanto, no

perdieron su capacidad nematicida. En este sentido, el resultado sugiere que los metabolitos presentes en los SLC y que tienen efecto inhibiendo la eclosión de huevos de *M. incognita* no son de carácter proteico y se necesitaban otras pruebas que permitieran determinar mediante otras características, los posibles metabolitos implicados en el control de *M. incognita*. Para esto, los SLC de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. gibsonii* EA-CB0579, fueron sometidos a fraccionamiento en fase sólida SPE. Las fracciones de 50% MetOH (F2) y 100% MetOH (F3) mantuvieron la actividad nematicida, mostrando una condición química más apolar, dado el tipo de columna (C18) y el solvente usado. Para la cepa EA-CB0015, Villegas-Escobar y colaboradores (2013), reportaron como la fracción eluída con 100% Met, OH tuvo la mayor actividad contra *Mycosphaerella fijiensis* y del mismo modo, detectaron en esta fase lipopéptidos cíclicos de la familia de las itutinas, fengicinas y surfactinas. Estos resultados sugieren la presencia de ciertos compuestos con acción nematicida de interés en la F3.

Pariendo de que la fracción eluída con 100% MetOH conservó efecto nematicida, se decidió separar mediante RP-HPLC los lipopéptidos de la F3, los cuales ya han sido reportados previamente en el control de diferentes fitopatógenos, incluídos *F. oxysporum*, *R. solani, C. acutatum* y *M. fijiensis* (Arroyave-Toro, Mosquera, & Villegas-Escobar, 2017; Villegas-Escobar et al., 2013). Los resultados evidenciaron como las Itu, Fen y Sur tuvieron un efecto inhibitorio de la eclosión de huevos de *M. incognita* al ser evaluados de forma independiente y a dos concentraciones. Éstos lipopéptidos cíclicos sintetizados por *Bacillus* spp., son antibióticos relacionados con efecto inhibitorio de fitopatógenos en general (Nihorimbere et al., 2012). Este grupo de microorganismos, considerados PGPR, tienen la capacidad de colonizar la rizosfera e interactuar de manera directa o indirectamente con otros microorganismos. Los mecanismos bajo los cuales estos microorganismos actúan directamente contra nematodos fitopatógenos, aún no se han dilucidado con exactitud (Aballay et al., 2017), pero se reporta la capacidad de péptidos cíclicos producidos por *B. amyloliquefaciens* contra *M. exigua* (Oliveira et al., 2014) y de surfactinas e iturinas producidas por *B. subtilis* contra la eclosión de huevos y movilidad de juevniles J2 de *M. incognita* (Kavitha et al., 2012).

5. Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

M. incognita es un nematodo fitopatógeno capaz de infectar variedades de plantas. Esta característica permitió el aislamiento del nematodo a partir de plantas de Sacha inchi y posterior infección en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Santa Clara), con lo cual se pudo establecer esta planta como modelo de estudio para el control de este nematodo.

Mediante las pruebas *in vitro* se seleccionaron 6 de los 10 productos nematicidas (Rugby®, Verango®, Safersoil®, Safelomyces®, QL Agri® y Sincocin®), los cuales tuvieron efecto en la disminución de la eclosión de huevos y movilidad de juveniles J2 de *M. incognita* y fueron llevados a pruebas bajo condiciones de invernadero. Estos mismos productos tuvieron efectividad reduciendo las nodulaciones y huevos / g raíz en plantas de tomate.

Los nematicidas de origen químico (Rugby®, Verango®) tuvieron los mejores reducciones en cuando a la eclosión (57% y 50%, respectivamente) y la movilidad de juveniles J2 (87% y 77%, respectivamente) de *M. incognita*. Estos mismos productos tuvieron efecto en la reducción en las nodulaciones en plantas de tomate en evaluaciones en invernadero (94% para Rugby® y 86% para Verango®).

Las pruebas realizadas con los nematicidas de origen biológico (Safersoil®, Safelomyces®), arrojaron reducciones de la eclosión del 22 y del 15% respectivamente, y la movilidad de juveniles J2 en un 37 y 14%, en el mismo orden. En las pruebas en invernadero, se obtuvieron reducciones en las nodulaciones en un 69 y 77% para Safelomyces® y Safersoil®, respectivamente en plantas de tomate.

Los nematicidas de origen vegetal (Sincosin® y QL Agri®), tuvieron efecto negativo reduciendo en un 49 y 43% la eclosión de huevos respecto a un control no tratado. Cuando fueron evaluados en invernadero, las nodulaciones se redujeron 74% (Sincosin®) y 71% (QL Agri®).

Los sobrenadantes libres de células (SLC) de las cepas bacterianas *B. pumilus* EA-CB0070, *B. PaeniBacillus* sp. EA-CB0305, *B. altitudinis* EA-CB0686, *B. gibsonii* EA-CB0579, *B. megaterium* EA-CB0784, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 y *B. amyloliquefaciens* EA-CB1329, *B. subtilis* EA-CB0575 y *B. subtilis* EA-CB0015, redujeron el porcentaje de eclosión de huevos y de movilidad de juveniles J2 de *M. incognita* en pruebas *in vitro* por encima del 60%, mostrando su potencial como organismos productores de metabolitos efectivos en el control del nematodo fitopatógeno.

De los sobrenadantes bacterianos evaluados en plantas de tomate, 6 de los 9 tuvieron efecto en la reducción de las nodulaciones ocasionadas por *M. incognita*. Los sobrenadantes de las cepas *B. pumilus* EA-CB0070, *B. amyloliquefaciens* EA-CB1329 y *PaeniBacillus* sp. EA-CB0305, tuvieron en promedio reducciones del 90%, seguidos de los tratamientos con *B. gibsonii* EA-CB0579, *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. subtilis* EA-CB0575 donde se encontró en promedio un 62% menos nodulaciones respecto al control negativo, mostrando la capacidad de estos sobrenadantes para reducir la severidad generada por *M. incognita* en plantas de tomate y bajo condiciones de invernadero.

La actividad nematicida de los SLC de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015, *B. pumilus* EA-CB0070 y *B. gibsonii* EA-CB0579 sobre huevos de *M. incognita*, fue estable a cambios de pH ácidos y hubo variaciones para la actividad nematicida de los SLC de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. pumilus* EA-CB0070 al ser sometidos a pH básico. Epecíficamente, cuando se trataron los SLC a pH 2 durante 24 h, estos mantuvieron su efecto nematicida. Para el caso del tratamiento a pH 10, la actividad nematicida de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. pumilus* EA-CB0070, disminuyó aproximadamente un 100% de su actividad inicial, mostrando algunas características de estabilidad de los metabolitos que pueden ejercer actividad contra el nematodo.

La actividad nematicida de los de los SLC de las cepas *B. subtilis* EA-CB0015, *B. pumilus* EA-CB0070 y *B. gibsonii* EA-CB0579 sobre la eclosión de huevos de *M. incognita*, no se vio afectada por cambios de temperatura entre 50 y 100 °C ni por acción enzimática por proteasas (proteinasa K), lo que sugiere que los metabolitos activos no son de carácter protéico.

La purificación parcial por SPE permitió determinar que la actividad nematicida de los SLC de las bacterias *B. subtilis* EA-CB0015 y *B. gibsonii* EA-CB0579 se mantuvo al ser eluídos con 50% y 100% MetOH, lo que permitió establecer las fracciones activas frente a la inhibición de la eclosión de huevos de *M. incognita*.

A partir de las fracciones activas, la separación mediante RP-HPLC de la fracción 100% MetOH, permitió obtener de forma independiente los lipopéptidos Itu, Fen, Sur, para los cuales la actividad nematicida se mantuvo, con porcentajes de inhibición de la eclosión de huevos de *M. incognita* del 42% para Fen, 29% para Itu y 50% para Sur.

Recomendaciones

Mediante los análisis taxonómicos realizados se pudo identificar la especie de *Meloidogyne* infectando plantas de Sacha inchi pero se recomienda realizar pruebas de identificación molecular para corroborar que la especie corresponda a *incognita*.

Evaluar otras dosis de *Meloidogyne* spp. en plantas de Sacha inchi para verificar la capacidad del nematodo en parasitar esta planta, así como diferentes materiales de la oleaginosa que puedan estar distribuidos a nivel nacional, podría ayudar a ampliar el conocimiento en la susceptibilidad y sintomatología en esta planta, además de una evaluación en un mayor período de exposición (6 meses).

En las evaluaciones en planta bajo condiciones de invernadero, el nematicida Rugby® generó una reducción del 52% aproximadamente en el peso fresco radicular de las plantas

de tomate, comparado con las plantas sin tratamiento, lo que podría afectar el crecimiento de la planta y su etapa productiva, por lo que se debe revisar el uso de este nematicida químico en este sistema.

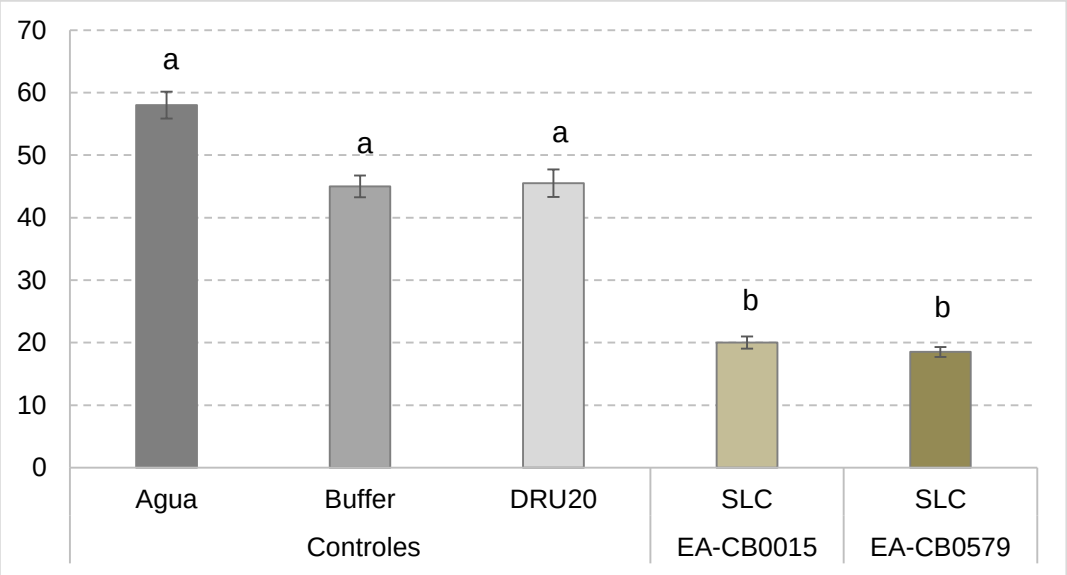
Los posibles metabolitos del SLC de la cepa *B. ginsonii* EA-CB0579 involucrados en el efecto inhibitorio contra *M. incognita*, podría ser caracterizados e identificarlos para dilucidar su posible forma de acción, debido que hasta el momento en que se realizó esta investigación, no se encuentran reportes de efecto nematicida de esta bacteria.

Los resultados a escala de invernadero para tomate deben ser validados en campo, ya que las condiciones de producción pueden influir en la efectividad de los nematicidas así como de los sobrenadantes bacterianos.

Finalmente, la evaluación de los SLC debe ser un primer paso para la selección de posibles bacterias controladoras de *M. incognita*, seguido de estudios de las formulaciones que se puedan desarrollar con estas bacterias, las cuales pueden ser distribuidas con mayor facilidad.

A. Anexo 1

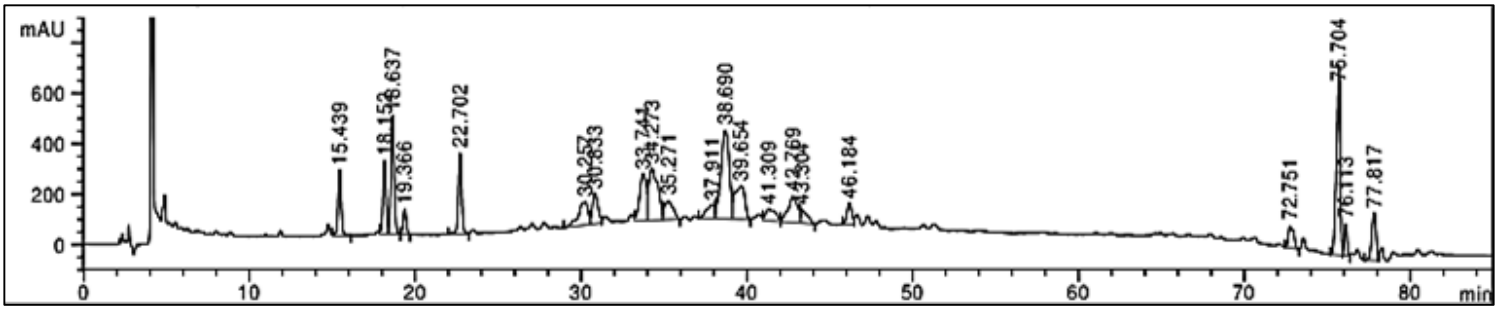
Análisis de controles y de SLC en prueba de fracciones recuperadas por SPE y su actividad nematicida.



Diferencias entre los controles y los SLC en la prueba fracciones recuperadas mediante SPE (3.5) de las cepas B. *subtilis* EA-CB0015 y B. gibsonii EA-CB0579 en la actividad nematicida sobre huevos de M. *incognita*. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los tratamientos (p-valor = 6.62e-10), según rangos múltiples de Tukey. Barras verticales denotan error estándar (n = 4).

B. Anexo 2

Cromatograma en fase reversa de la fracción SPE 100% MetOH de *B. subtilis* EA-CB0015, obtenido con el gradiente 20%, 40%, 60%, 80% y 100% MetOH.



6. Bibliografía

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), 1–14. http://doi.org/10.1007/s11274-017-2303-9

Abdel-Salam, M. S., Ameen, H. H., Soliman, G. M., Elkelany, U. S., & Asar, A. M. (2018). Improving the nematicidal potential of *Bacillus amyloliquefaciens* and Lysini *Bacillus sphaericus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* using protoplast fusion technique. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *28*(31), 1–6. http://doi.org/10.1186/s41938-018-0034-3

Affokpon, A., Coyne, D. L., Htay, C. C., Agbèdè, R. D., Lawouin, L., & Coosemans, J. (2011). Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. *Soil Biology and Biochemistry*, *43*(3), 600–608. http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.029

Agbenin, N. O., Emechebe, A. M., Marley, P. S., & Akpa, A. D. (2005). Evaluation of nematicidal action of some botanicals on *Meloidogyne incognita in vivo* and *in vitro*. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics*, *106*(1), 29–39.

Agronet. (2014). Comparativo en la producción de Sacha inchi en los departamentos de Amazonas - Putumayo , 2007-2012. Retrieved from http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/VerReporte.aspx

Agronet. (2018). Comparativo de área, producción, rendimiento y participación departamental por cultivo. Retrieved May 21, 2018, from http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx

Aktar, M. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, *2*(1), 1–12. http://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7

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. http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.10.004

Álvarez, L. F., & Rios, S. J. (2007). *Estudio de viabilidad económica del cultivo de Plukenetia volubilis Linneo " sacha inchi " – departamento de San Martin*. Iquitos, Perú.

Anastasiadis, I. A., Giannakou, I. O., Prophetou-Athanasiadou, D. A., & Gowen, S. R. (2008). The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. *Crop Protection*, *27*(3–5), 352–361. http://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.06.008

Andrés, M. F., González-Coloma, A., Sanz, J., Burillo, J., & Sainz, P. (2012). Nematicidal activity of essential oils: A review. *Phytochemistry Reviews*, *11*(4), 371–390. http://doi.org/10.1007/s11101-012-9263-3

Arias, Y., González, I., Rodríguez, M., Rosales, C., Suárez, Z., & Peteira, B. (2009). Aspectos generales de la interacción tomate (Solanum lycopersicon L.) - *Meloidogyne incognita*. *Revista Protección Vegetal*, *24*(1), 1–13.

Arroyave-Toro, J. J., Mosquera, S., & Villegas-Escobar, V. (2017). Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological Control*, *114*(7), 195–200. http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.014

Ayala Martínez, G. A. (2016). *Análisis de Crecimiento y producción de 3 variedades de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis *L.), en el Municipio de Tena, Cundinamarca.* Universidad de Ciencias aplicadas y Ambientales.

Bebber, D. P., Holmes, T., & Gurr, S. J. (2014). The global spread of crop pests and pathogens. *Global Ecology and Biogeography*, *23*(12), 1398–1407. http://doi.org/10.1111/geb.12214

Beg, Q.K., Gupta, R. (2003). Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependant serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, *32*, 294–304.

Bellafiore, S., & Briggs, S. P. (2010). Nematode effectors and plant responses to infection. *Current Opinion in Plant Biology*, *13*(4), 442–8. http://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.05.006

Bellafiore, S., Shen, Z., Rosso, M. N., Abad, P., Shih, P., & Briggs, S. P. (2008). Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS Pathogens*, *4*(10). http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000192

Bird, D. M., Opperman, C. H., & Davies, K. G. (2003). Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: now and then. *International Journal for Parasitology*, *33*(11), 1269–1276. http://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00160-7

Cai, Z. Q. (2011). Shade delayed flowering and decreased photosynthesis, growth and yield of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) plants. *Industrial Crops and Products*, *34*(1), 1235–1237. http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.021

Cai, Z. Q., Zhang, T., & Jian, H. Y. (2013). Chromosome number variation in a promising oilseed woody crop, *Plukenetia volubilis* L. (Euphorbiaceae). *Caryologia*, *66*(1), 54–58. http://doi.org/10.1080/00087114.2013.780442

Cardinal-McTeague, M., & Gillespie, L. J. (2016). Molecular phylogeny and pollen evolution of Euphorbiaceae tribe Plukenetieae. *Systematic Biology*, *41*(2), 329–347. http://doi.org/10.1600/036364416X691759

Cardona-Bustos, N., Borrego, D. A., Fernández, E. P., Sánchez, J., Cardona, V., & Montoya, G. (2014). Microbiological evaluation and pathogenicity of a liquid bioformulation of the fungus *Purpureocillium* sp. (strain UdeA 0109) on *Meloidogyne incognita-javanica* stages. *Biotecnología Aplicada*, *31*, 210–215.

Cardona-Bustos, N., Pavas, H., & Fernández, E. P. (2014). Efecto del filtrado crudo de *Purpureocillium* sp . (Cepa UdeA0106), sobre la eclosión de huevos y movilidad de juveniles de *Meloidogyne incognita-javanica*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *XVI*(2), 37–44.

Castro Sánchez, M. M. (2013). *Tolerancia del Sacha inchi (*Plukenetia volubilis *L.), a nemátodos fitoparásitos del género* Meloydogyne *spp., bajo condiciones de invernadero en la estación experimental agraria "El Porvenir"- Juan Guerra.* Universidad Nacional de San Martín.

Chen, S. Y., Charnecki, J., Preston, J. F., & Dickson, D. W. (2000). Extraction and purification of *Pasteuria* spp. endospores. *Journal of Nematology*, *32*(1), 78–84.

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. http://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.04.016

Coyne, D. . L., Nicol, J. . M., & Claudius-Cole, B. (2007). *Practical plant nematology : A field and laboratory guide*. Cotonou: SP-IPM Secretariat.

Curtis, R. H. C. (2007). Plant parasitic nematode proteins and the host parasite interaction. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, *6*(1), 50–8. http://doi.org/10.1093/bfgp/elm006

Deng, A., Zhang, G., Shi, N., Wu, J., Lu, F., & Wen, T. (2014). Secretory expression, functional characterization, and molecular genetic analysis of novel halo-solvent-tolerant protease from *Bacillus gibsonii*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(2), 197–208. http://doi.org/10.4014/jmb.1308.08094

El-Nagdi, W. M. A.-E., & Youssef, M. M. A. (2013). Comparative efficacy of garlic clove and castor seed aqueous extracts against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infecting tomato plants. *Journal of Plant Protection Research*, *53*(3), 285–288. http://doi.org/10.2478/jppr-2013-0042

El-Nagdi, W. M. A., & Youssef, M. M. A. (2004). Soaking faba bean seed in some bio-

agents as prophylactic treatment for controlling *Meloidogyne incognita* root-knot nematode infection. *Journal of Pest Science*, *77*(2), 75–78. http://doi.org/10.1007/s10340-003-0029-y

Escobar, H., & Lee, R. (Eds.). (2009). *Manual de producción de tomate bajo invernadero*. *Manual de producción de tomate bajo invernadero* (Vol. 1). Bogotá: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Faske, T. R., & Hurd, K. (2015). Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to Fluopyram. *Journal of Nematology*, *47*(4), 316–321. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2586449&tool=pmcentrez &rendertype=abstract

Ghazalbash, N., & Abdollahi, M. (2013). Effect of medicinal plant extracts on physiological changes in tomato , inoculated with *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f. sp . *lycopersici*. *Pakistan Journal of Nematology*, *31*(1), 21–37.

Giannakou, I. O. (2011). Efficacy of a formulated product containing *Quillaja saponaria* plant extracts for the control of root-knot nematodes. *European Journal of Plant Pathology*, *130*(4), 587–596. http://doi.org/10.1007/s10658-011-9780-8

Gonçalves Borges, F., Kuhn Odair, J., Battistus, A. G., Lopez Estevez, R., & Coltro, S. (2013). Toxidade de tratamentos alternativos e químicos *in vitro* sobre *Tubixaba tuxaua* e *Meloidogyne incognita*. *Scientia Agraria Paranaensis*, *12*(January), 440–449. http://doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v12nsupp440-449

González-Jaramillo, L. M., Aranda, F. J., Teruel, J. A., Villegas-Escobar, V., & Ortiz, A. (2017). Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *156*, 114–122. http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.021

Guillén, M. D., Ruiz, A., Cabo, N., Chirinos, R., & Pascual, G. (2003). Characterization of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR spectroscopy and 1H NMR. Comparison with linseed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *80*(8), 755–762. http://doi.org/10.1007/s11746-003-0768-z

Guo, S., & Kenne, L. (2000). Structural studies of triterpenoid saponins with new acyl components from *Quillaja saponaria* Molina. *Phytochemistry*, *55*(5), 419–428. http://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00340-X

Gutiérrez, L. F., Rosada, L. M., & Jiménez, Á. (2011). Chemical composition of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. *Grasas y Aceites*, *62*(1), 76–83. http://doi.org/10.3989/gya044510

Hong, S. H., Anees, M., & Kim, K. Y. (2013). Biocontrol of *Meloidogyne incognita* inciting disease in tomato by using a mixed compost inoculated with *Paenibacillus ehimensis* RS820. *Biocontrol Science and Technology*, *23*(9), 1024–1039. http://doi.org/10.1080/09583157.2013.811468

Huang, Y., Xu, C. K., Ma, L., Zhang, K. Q., Duan, C. Q., & Mo, M. H. (2010). Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology*, *126*(3), 417–422. http://doi.org/10.1007/s10658-009-9550-z

Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. (2014a). Listado de Productos Bioinsumos registrados. Retrieved from http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas/Listado-de-Bioinsumos/2009/PRODUCTOS-BIOINSUMOS-MAYO-13-DE-2008.aspx

Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. (2014b). Listado de Registros nacionales de plaguicidas químicos de uso agrícola. Retrieved from http://www.ica.gov.co/getdoc/d3612ebf-a5a6-4702-8d4b-8427c1cdaeb1/REGISTROS-NACIONALES-PQUA-15-04-09.aspx

Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. (2017a). Listado de productos registrados en el ICA- Permitidos en agricultura ecológica. Retrieved September 11, 2017, from https://www.ica.gov.co/getattachment/Areas/Agricola/INSUMOS-PERMITIDOS-AGICULTURA-ECOLOGIA.pdf.aspx

Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. (2017b). Registros de venta de plaguicidas quimicos de uso agricola. Retrieved from http://www.ica.gov.co/getdoc/d3612ebf-a5a6-4702-8d4b-8427c1cdaeb1/REGISTROS-NACIONALES-PQUA-15-04-09.aspx

Jamal, Q., Cho, J., Moon, J., Munir, S., Anees, M., & Kim, K. Y. (2017). Identification for the first time of cyclo (D -Pro- L -Leu) Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 as a Nematocide for Control of *Meloidogyne incognita*. *Molecules*, *22*(1839), 1–16. http://doi.org/10.3390/molecules22111839

Jansen-Girgan, C., Claassens, S., & Fourie, H. (2016). *In vitro* evaluations to determine the effect of *Bacillus firmus* strains on the motility of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles. *Tropical Plant Pathology*, *41*(5), 320–324. http://doi.org/10.1007/s40858-016-0100-x

Jaramillo, J., Rodríguez, V., Guzmán, M., Zapata C., M., & Rengifo, T. (2007). *Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas*. Organización de las Naciones Unodas para la Agricultura y la Alimentación-FAO. Retrieved from http://www.fao.org.co/manualtomate.pdf

Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., … Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *14*(9), 946–61. http://doi.org/10.1111/mpp.12057

Kavitha, P. . G., Jonathan, E. I., & Nakkeeran, S. (2012). Effects of crude antibiotic of *Bacillus subtilis* on hatching of eggs and mortality of juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, *40*, 203–206.

Khan, M., Haque, Z., & Kausar, N. (2014). Management of the root-knot nematode

Meloidogyne graminicola infesting rice in the nursery and crop field by integrating seed primingand soil application treatments of pesticides. *Crop Protection*, *63*, 15–25. http://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.024

Khan, Z., Kim, S. . G., Jeon, Y. . H., Khan, H. U., Son, S. . H., & Kim, Y. . H. (2008). A plant growth promoting rhizobacterium , *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1 , suppresses root-knot nematode, *99*, 3016–3023. http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.031

Kiewnick, S., Neumann, S., Sikora, R. a, & Frey, J. E. (2011). Effect of *Meloidogyne incognita* inoculum density and application rate of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 on biocontrol efficacy and colonization of egg masses analyzed by real-time quantitative PCR. *Phytopathology*, *101*(1), 105–12. http://doi.org/10.1094/PHYTO-03-10-0090

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. http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.12.006

Kim, H.-S., Yoon, B.-D., Lee, C.-H., Suh, H.-H., Oh, H.-M., Katsuragi, T., & Tani, Y. (1997). Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *84*(1), 41–46.

Lamovšek, J., Urek, G., & Trdan, S. (2013). Biological Control of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.): Microbes against the pests. *Acta Agriculturae Slovenica*, *101*(2), 263–275. http://doi.org/10.2478/acas-2013-0022

Lee, Y. S., & Kim, K. Y. (2015). Antagonistic potential of *Bacillus pumilus* L1 Against root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Phytopathology*, *164*(1), 29–39. http://doi.org/10.1111/jph.12421

Leiva Piedra, J. L. (2009). *Evaluación del hongo nematófago Pochonia chlamydosporia, en el control del nemátodo del nudo* Meloidogyne *sp., en el cultivo de Sacha inchi* Plukenetia volubilis *bajo condiciones de vivero*. Universidad Nacional de San Martín.

Manco-Céspedes, E. I. (2006). *Cultivo de sacha inchi*. San Martín, Perú.

Márquez Dávila, K., Gonzalez, R., Arévalo, L., & Solis, R. (2013). Respuesta de accesiones de sacha inchi *Plukenetia volubilis* L . a la infestación inducida del nematodo *Meloidogyne incognita* (Kofoit and White, 1919) Chitwood, 1949. *Folia Amazónica*, *22*(1–2), 97–103.

Márquez, K., Cayotopa, E., Arévalo, E., Vivanco, U., & Arévalo, J. (2007). Diagnóstico y niveles de inóculo del nematodo que afecta a la raíz de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) en el Perú. In *Resúmenes del XIX Congreso Peruano de Fitopatología* (Vol. 42, pp. 52–53). Cajamarca.

Martinez, R., Jakob, F., Tu, R., Siegert, P., Maurer, K. H., & Schwaneberg, U. (2013). Increasing activity and thermal resistance of *Bacillus gibsonii* alkaline protease (BgAP) by directed evolution. *Biotechnology and Bioengineering*, *110*(3), 711–720. http://doi.org/10.1002/bit.24766

Mervat, A. a., Shawky, S. M., & Shaker, G. S. (2012). Comparative efficacy of some bioagents, plant oil and plant aqueous extracts in controlling *Meloidogyne incognita* on growth and yield of grapevines. *Annals of Agricultural Sciences*, *57*(1), 7–18. http://doi.org/10.1016/j.aoas.2012.03.009

Mosquera, S., González-Jaramillo, L. M., Orduz, S., & Villegas-Escobar, V. (2014). Multiple response optimization of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture and identification of antifungal metabolites. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *3*(4), 378–385. http://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.004

Nasr, H. M. (2015). Toxicity and biochemical effect of organophosphates and bio-pesticides against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Pollution Effects & Control*, *04*(01), 1–9. http://doi.org/10.4172/2375-4397.1000151

Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiology Ecology*, *79*(1), 176–191. http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01208.x

Nitschke, M., & Pastore, G. M. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, *97*(2), 336–341. http://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.044

Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiology Ecology*, *79*(1), 176–191. http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01208.x

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*, 710–715. http://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.7.710

Oliveira, D. F., Dos Santos, H. M., Nunes, A. S., Campos, V. P., De Pinho, R. S. C., & Gajo, G. C. (2014). Purification and identification of metabolites produced by *Bacillus cereus* and *B. subtilis* active against *Meloidogyne exigua*, and their in silico interaction with a putative phosphoribosyltransferase from *M*. *incognita*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, *86*(2), 525–538. http://doi.org/10.1590/0001-3765201402412

Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, *16*(3), 115–125. http://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., … Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, *9*(4), 1084–1090. http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x

Ortiz, B. V, Perry, C., Goovaerts, P., Vellidis, G., & Sullivan, D. (2010). Geostatistical

modeling of the spatial variability and risk areas of southern root-knot nematodes in relation to soil properties. *Geoderma*, *156*(3–4), 243–252. http://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.02.024

Padgham, J. L., & Sikora, R. a. (2007). Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. *Crop Protection*, *26*(7), 971–977. http://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.09.004

Perry, R. N., & Moens, M. (2006). *Plant Nematology*. (R. N. Perry & M. Moens, Eds.). CABI.

Perry, R. N., Moens, M., & Starr, J. L. (2009). *Root-Knot Nematodes*. (R. N. Perry, M. Moens, & J. L. Starr, Eds.). CABI.

Pinkerton, J. N., & Kitner, M. L. C. (2006). Effects of biologically-derived products on mobility and reproduction of the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*, on strawberry. *Nematropica*, *36*(2), 181–196. Retrieved from http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33846887433&partnerID=tZOtx3y1

Ploeg, A. T., & Maris, P. C. (1999). Effects of temperature on the duration of life cycle of a *Meloidogyne incognita* population. *Nematology*, *1*(4), 389–393.

Posada, L. F., Ramírez, M., Ochoa-Gómez, N., Cuellar-Gaviria, T. Z., Argel-Roldan, L. E., Ramírez, C. A., & Villegas-Escobar, V. (2016). Bioprospecting of aerobic endospore-forming bacteria with biotechnological potential for growth promotion of banana plants. *Scientia Horticulturae*, *212*, 81–90. http://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.040

Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(6), 1037–1062. http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x

Radwan, M. A., Farrag, S. A. A., Abu-Elamayem, M. M., & Ahmed, N. S. (2012a). Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology*, *56*, 58–62. http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.008

Radwan, M. A., Farrag, S. A. A., Abu-Elamayem, M. M., & Ahmed, N. S. (2012b). Efficacy of some granular nematicides against root-knot nematode , *Meloidogyne incognita* associated with tomato. *Pak. J. Nematol.*, *30*(1), 41–47.

Rahman Khan, M., Haque, Z., & Nida, K. (2014). Management of the root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* infesting rice in the nursery and crop field by integrating seed priming and soil application treatments of pesticides. *Crop Protection*, *63*, 15–25.

Rainer, B. (2017). Phytostimulation and Biocontrol by the Plant- Associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: An Update. In T. M. Islam (Ed.), *Bacilli and Agrobiotechnology* (pp. 163–184). Springer International. http://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3

Ravichandra, N. G. (2014). Phytonematodes: Threat to Horticulture. In *Horticultural Nematology* (pp. 13–16). Bangalore: Springer.

Rohini, H. M., Ekanayake, H., & Vito, M. (1986). Life cycle and multiplicationof *Meloidogyne incognita* on tomato and agg pland seedlings. *Tropical Agriculturist*, *142*, 1–8.

Safdar, H., Javed, N., Khan, S. A., Haq, I., Safdar, A., & Khan, N. A. (2012). Control of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood by Cadusafos (Rugby ®) on Tomato. *Pakistan Journal of Zoology*, *44*(6), 1703–1710.

Sahebani, N., & Hadavi, N. (2008). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne* javanica by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*(8), 2016–2020. http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.011

Saikia, S. K., Tiwari, S., & Pandey, R. (2013). Rhizospheric biological weapons for growth enhancement and *Meloidogyne incognita* management in *Withania somnifera* cv. Poshita. *Biological Control*, *65*(2), 225–234. http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.01.014

San Martín, R., & Magunacelaya, J. C. (2005). Control of plant-parasitic nematodes with extracts of *Quillaja* saponaria. *Nematology*, *7*(4), 577–585. http://doi.org/10.1163/156854105774384732

Seid, A., Fininsa, C., Mekete, T., Decraemer, W., & Wesemael, W. M. L. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) – a century-old battle. *Nematology*, *17*(9), 995–1009. http://doi.org/10.1163/15685411-00002935

Sharon, E., Chet, I., & Spiegel, Y. (2009). Improved attachment and parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica in vitro*. *European Journal of Plant Pathology*, *123*(3), 291–299. http://doi.org/10.1007/s10658-008-9366-2

Schallmey, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, *50*(1), 1–17. http://doi.org/10.1139/w03-076

Shin, S. C., Park, I. K., Choi, I. H., Park, J. H., Kim, C. S., Kim, K. H., & Choi, K. S. (2005). Nematicidal activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*) oils against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Nematology*, *7*(5), 767–774. http://doi.org/10.1163/156854105775142946

Siddiqui, I., & Shahid Shaukat, S. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylpholoroglucinol. *Soil Biology and Biochemistry*, *35*(12), 1615–1623. http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.08.006

Siddiqui, I., & Shaukat, S. (2003). Endophytic Bacteria : Prospects and opportunities for

the biological control of plant-parasitic nematodes. *Nematologia Mediterranea*, *1*(31), 111–120.

Siddiqui, Z. A. (2004). Effects of plant growth promoting bacteria and composed organic fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and tomato growth. *Bioresource Technology*, *95*(2), 223–227. http://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.01.002

Singh, S., Hodda, M., Ash, G., & Banks, N. (2013). Plant-parasitic nematodes as invasive species: Characteristics, uncertainty and biosecurity implications. *Annals of Applied Biology*, *163*, 323–350. http://doi.org/10.1111/aab.12065

Singh, S., Singh, B., & Singh, A. (2015). Nematodes: A threat to sustainability of agriculture. In *Procedia Environmental Sciences* (Vol. 29, pp. 215–216). Elsevier B.V. http://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.270

Singh, V., Mawar, R., & Lodha, S. (2012). Combined effects of biocontrol agents and soil amendments on soil microbial populations, plant growth and incidence of charcoal rot of cowpea and wilt of cumin. *Phytopathologia Mediterranea*, *51*(2), 307–316.

Sokhandani, Z., Reza, M., & Basirnia, T. (2016). Optimum concentrations of *Trichoderma longibrachiatum* and cadusafos for controlling *Meloidogyne javanica* on zucchini plants. *Journal of Nematology*, *48*(1), 54–63.

Subramanian, P., Oh, B., Mani, V., Lee, J. K., Lee, C., Sim, J., Hahn, B. (2017). Differential metabolic profiles during the developmental stages of plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Ijms*, *18*(1351). http://doi.org/10.3390/ijms18071351

Tamalika, S., & Ramakrishnan, S. (2016). Influence of biomolecules of *Bacillus* spp. against phytopathogens: A Review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, *5*(7), 131–134. http://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.507.012

Terefe, M., Tefera, T., & Sakhuja, P. K. (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), 94–9. http://doi.org/10.1016/j.jip.2008.11.004

Timper, P. (2014). Conserving and enhancing biological control of nematodes. *Journal of Nematology*, *46*(2), 75–89.

Udo, I. A., Uguru, M. I., & Ogbuji, R. O. (2013). Pathogenicity of *Meloidogyne incognita* race 1 on tomato as influenced by different arbuscular mycorrhizal fungi and bioformulated *Paecilomyces lilacinus* in a dysteric cambisol Soil. *Journal of Plant Protection Research*, *53*(1). http://doi.org/10.2478/jppr-2013-0011

Viggiano, J. R., de Freitas, L. G., & Lopes, E. a. (2014). Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. *Biological Control*, *69*, 72–77. http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.11.004

Villegas-Escobar, V. (2012). *Identificación y caracterización de extractos bacterianos biológicamente activos contra patógenos de* Musa *sp.* Universidad Nacional de Colombia.

Villegas-Escobar, V., Ceballos, I., Mira, J. J., Argel, L. E., Orduz Peralta, S., & Romero-Tabarez, M. (2013). Fengycin C produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *Journal of Natural Products*, *76*(4), 503–509. http://doi.org/10.1021/np300574v

Wang, Y., Xie, Y., Cui, H. D., & Dong, Y. (2014). First Report of *Meloidogyne javanica* on Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) in China. Retrieved September 22, 2014, from http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-03-13-0241-PDN

Woo-Jin, J., Jung, S.-J., Park, R.-D., Kim, K.-Y., Seong, K.-Y., & Kim, T.-H. (2002). Effect of chitinase produced form *Paneibacillus illinoisensis* on egg hatching of root-knot nematode, *Meloidogyne* spp. *Journal of Microbiology and Biotechnology Biotechnol*, *12*(6), 865–871.

Xia, Y., Xie, S., Ma, X., Wu, H., Wang, X., & Gao, X. (2011). The purL gene of *Bacillus subtilis* is associated with nematicidal activity. *FEMS Microbiology Letters*, *322*(2), 99–107. http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02336.x

Xiong, J., Zhou, Q., Luo, H., Xia, L., Li, L., Sun, M., & Yu, Z. (2015). Systemic nematicidal activity and biocontrol efficacy of *Bacillus firmus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *31*(4), 661–7. http://doi.org/10.1007/s11274-015-1820-7

Yang, L. Y., Chen, P., Zhou, Y., Wang, G. F., Du, Q. J., & Huang, J. S. (2017). First Report of vine wilt disease caused by *Fusarium solani* on Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) in China. *Plant Disease*, 1–3.

Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., & Bertagnolli, B. L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, *34*(7), 955–963. http://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00027-5

Zhang, W., Ruan, W., Deng, Y., & Gao, Y. (2012). Potential antagonistic effects of nine natural fatty acids against *Meloidogyne incognita*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(46), 11631–7. http://doi.org/10.1021/jf3036885

Zhao, D., Zhao, H., Zhao, D., Zhu, X., Wang, Y., Duan, Y.,Chen, L. (2018). Isolation and identification of bacteria from rhizosphere soil and their effect on plant growth promotion and root-knot nematode disease. *Biological Control*, *119*(January), 12–19. http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.01.004