



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Universidad Nacional de La Plata

Caracterización de interacciones planta – microorganismos  
beneficiosas para el control de *Nacobbus aberrans* en pimiento.

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Facultad de Ciencias Agrarias y  
Forestales

Ing. Agr. Valeria F. Bernardo

Directora: Dra. Marcela F. Ruscitti

Co- Director: Dr. Mario C. N. Saparrat

14 de julio 2022



## **Agradecimientos**

A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP), por permitirme realizar mi formación de postgrado, a la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires por la beca de estudios que me permitió dedicarme a tiempo completo al doctorado, y a las autoridades del Instituto de Fisiología Vegetal, por brindarme y facilitarme las instalaciones para el desarrollo de esta tesis.

A mi directora Marcela, por aceptarme como tesista y guiarme durante todos estos años. Por enseñarme, escucharme, aconsejarme y apoyarme en todo lo necesario para que pueda culminar con este trabajo. Por su tiempo y generosidad.

A mi codirector Mario, también por aceptarme, estar atento a mis dudas y predispuesto siempre a contribuir a mi formación.

A Ceci, a quien considero mi otra directora, por contribuir a mi formación, escucharme, estar atenta a mis dificultades y brindarme ayuda en todo momento.

A Seba, mi compañero de beca, por integrarme al grupo apenas llegué e inculcarme todo sus conocimientos sobre nematodos, por cada charla y ensayos compartidos.

A Laura por brindarme su ayuda con los ensayos y por hacerme pasar buenos momentos en la oficina.

A Juan y a Matias por brindarme ayuda con los ensayos para llevar a cabo esta tesis. A Irina, Andressa, Jean, Hozano, Martina, Tatiana, Fede y Tobias por aportar a mi tesis ya sea ayudando, acompañando o compartiendo mates.

A mi familia, sin ellos no sería quien soy hoy, sin ellos no hubiera llegado a donde estoy, siempre alentándome con mi formación.

A mis amigos, mis forestales y mis agrónomos, por estar siempre conmigo escuchando y alentándome. Por compartir tantos años conmigo.

A los técnicos, becarios e investigadores del infive que siempre fueron atentos ante mis dudas y me ayudaron en mi aprendizaje.

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	15
RESUMEN .....	16
ABSTRACT.....	19
Publicaciones vinculadas a esta Tesis doctoral.....	21
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	23
1.1- NEMATODOS FITOPARÁSITOS: CONTEXTO.....	24
1.2- <i>Nacobbus aberrans</i> .....	31
1.3- MICROORGANISMOS CON POTENCIAL NEMATICIDA.....	39
1.3.1- Hongos micorrizicos arbusculares .....	40
1.3.2- Hongos nematófagos .....	47
1.3.3- Rizobacterias .....	53
1.4- INTERACCIONES EN LA RIZÓSFERA .....	57
1.4.1- Interacciones para el control biológico.....	59
1.5- HIPOTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	59
1.5.1- Hipótesis.....	59
1.5.2- Objetivo general.....	59
1.5.3- Objetivos particulares .....	60
1.6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
CAPÍTULO 2 Alteraciones morfofisiológicas y estrés oxidativo causado por <i>Nacobbus aberrans</i> en plantas de pimiento. ....	74
2.1- INTRODUCCIÓN.....	75
2.2- OBJETIVO.....	76
2.3- ENSAYO EXPERIMENTAL .....	76
2.4- RESULTADOS .....	83
2.5- DISCUSIÓN.....	89
2.6- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	93
Capítulo 3 Hongos formadores de micorrizas arbusculares como potenciales antagonistas de <i>Nacobbus aberrans</i> . ....	100
3.1- INTRODUCCIÓN.....	101
3.3- ENSAYO EXPERIMENTAL .....	102
3.4- RESULTADOS .....	107
3.5- DISCUSIÓN.....	114
3.6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	117
Capítulo 4 Hongos nematófagos con potencial antagonismo sobre de <i>Nacobbus aberrans</i> . ..	122

4.1- INTRODUCCIÓN.....	123
4.3- ENSAYO EXPERIMENTAL .....	124
4.4- RESULTADOS:.....	127
4.5- DISCUSIÓN.....	134
4.6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	136
Capítulo 5 Rizobacterias con potencial antagonismo sobre <i>Nacobbus aberrans</i> .....	139
5.1- INTRODUCCIÓN.....	140
5.2- OBJETIVOS.....	141
5.3- ENSAYO EXPERIMENTAL .....	141
5.4- RESULTADOS:.....	143
5.5- DISCUSIÓN.....	150
5.6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	152
Capítulo 6 Interacciones de microorganismos para el control biológico de <i>Nacobbus aberrans</i> . .....	157
6.1- INTRODUCCIÓN.....	158
6.2- OBJETIVOS.....	159
6.3- ENSAYO EXPERIMENTAL .....	159
6.4- RESULTADOS .....	163
6.5- DISCUSION.....	180
6.6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	183
Capítulo 7 Conclusiones y consideraciones finales .....	188
7.1- Conclusiones generales.....	189
7.2- Perspectivas a futuro. ....	190
ANEXO .....	191

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Clasificación de nematodos fitoparásitos. ....	24
<b>Figura 1.2:</b> Interacción planta-rizobacterias en la rizosfera. ....	51
<b>Figura 2.1:</b> Contenido de proteínas solubles de plantas de pimiento no inoculadas (control) o inoculadas con <i>Nacobbus aberrans</i> (inoculado). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). ....	82
<b>Figura 3.1:</b> Contenido de prolina en hojas (a) y en raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): <i>Funneliformis mosseae</i> (FM), <i>Rhizophagus intraradices</i> B1 (RI B1), y <i>Rhizophagus intraradices</i> A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) <i>N. aberrans</i> en el suelo.....	6
<b>Figura 3.2:</b> Contenido de azúcares totales (a) y reductores (b) en hojas de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): <i>Funneliformis mosseae</i> (FM), <i>Rhizophagus intraradices</i> B1 (RI B1), y <i>Rhizophagus intraradices</i> A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo .....	7
<b>Figura 3.3:</b> Contenido de compuestos fenólicos en hojas (a) y en raíz (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): <i>Funneliformis mosseae</i> (FM), <i>Rhizophagus intraradices</i> B1 (RI B1), y <i>Rhizophagus intraradices</i> A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo .....	8
<b>Figura 3.4:</b> Conductividad relativa de membranas en hojas (a) y raíz (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): <i>Funneliformis mosseae</i> (FM), <i>Rhizophagus intraradices</i> B1 (RI B1), y <i>Rhizophagus intraradices</i> A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo .....	9
<b>Figura 3.5:</b> Contenido de MDA en hojas (a) y raíz (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): <i>Funneliformis mosseae</i> (FM), <i>Rhizophagus intraradices</i> B1 (RI B1), y <i>Rhizophagus intraradices</i> A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo. ....	10
<b>Figura 4.1:</b> Conductividad relativa de las membranas de hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos nematófagos: <i>Pleurotus ostreatus</i> (PO) y <i>Purpureocillium lilacinum</i> (PL); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo.....	16

<b>Figura 4.2:</b> Contenido de prolina en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos nematófagos: <i>Pleurotus ostreatus</i> (PO) y <i>Purpureocillium lilacinum</i> (PL); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo.....	17
<b>Figuras 4.3:</b> Contenido de azúcares totales en hojas (a). Contenido de azúcares reductores en hojas (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos nematófagos: <i>Pleurotus ostreatus</i> (PO) y <i>Purpureocillium lilacinum</i> (PL); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo. 17	
<b>Figuras 4.4:</b> Contenido de compuestos fenólicos en hojas (a) y en raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos nematófagos: <i>Pleurotus ostreatus</i> (PO) y <i>Purpureocillium lilacinum</i> (PL); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo.....	18
<b>Figura 4.5:</b> Contenido de MDA en hojas de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos nematófagos: <i>Pleurotus ostreatus</i> (PO) y <i>Purpureocillium lilacinum</i> (PL); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo. ....	29
<b>Figura 5.1:</b> Conductividad relativa de membranas de hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con las bacterias: <i>Azospirillum brasilense</i> (AB), <i>Bacillus subtilis</i> (BS) y <i>Bacillus thuringiensis var Kurstaki</i> (BT); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo.....	43
<b>Figura 5.2:</b> Contenido de prolina en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con las bacterias: <i>Azospirillum brasilense</i> (AB), <i>Bacillus subtilis</i> (BS) y <i>Bacillus thuringiensis var Kurstaki</i> (BT); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo.....	44
<b>Figura 5.3:</b> Contenido de azúcares totales en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con las bacterias: <i>Azospirillum brasilense</i> (AB), <i>Bacillus subtilis</i> (BS) y <i>Bacillus thuringiensis var Kurstaki</i> (BT); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo.....	44
<b>Figura 5.4:</b> Contenido de azúcares reductores en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con las bacterias: <i>Azospirillum brasilense</i> (AB), <i>Bacillus subtilis</i> (BS) y <i>Bacillus thuringiensis var Kurstaki</i> (BT); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo.....	45
<b>Figura 5.5:</b> Contenido de compuestos fenólicos en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con las bacterias: <i>Azospirillum brasilense</i> (AB), <i>Bacillus subtilis</i> (BS) y <i>Bacillus thuringiensis var Kurstaki</i> (BT); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo.....	45

<b>Figura 6.1:</b> Contenido de clorofila en hojas de plantas de pimiento del primer muestreo (a) y del segundo muestreo (b) no inoculadas (NI) e inoculadas con los microorganismos seleccionados individual y combinados en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo .....	58
<b>Figura 6.2:</b> Contenido de proteínas en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los microorganismos seleccionados individual y combinados en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo. ....	69
<b>Figura 6.3:</b> Conductividad relativa de membranas celulares en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los microorganismos seleccionados individual y combinados en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo. ....	71
<b>Figura 6.4:</b> Contenido de prolina en hojas de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los microorganismos seleccionados individual y combinados en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo. 72	
<b>Figura 6.5:</b> Contenido de MDA en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los microorganismos seleccionados individual y combinados en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo. ....	74

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>Imagen 1.1:</b> Formas de parasitismo de géneros reportados de nematodos parásitos de raíces (Siddiqui, 2000). .....	3
<b>Imagen 1.2:</b> Ubicación del Cinturón Hortícola de La Plata, Provincia de Buenos Aires (Argentina) (Alonso et al., 2016). .....	27
<b>Imagen 1.3:</b> Representación del ciclo biológico de <i>N. aberrans</i> . A) etapa embriogénesis, B) segunda etapa larvaria, ataca raíces, C) J2, J3, J4 y hembras jóvenes invaden la raíz como inoculo primario, D) J2 se alimentan de células puede salir y reinfectar la raíz formando falsos nudos, E) tercera etapa larvaria, F) cuarta etapa larvaria, G) nematodos adultos, el macho abandona la raíz, H) hembra deposita huevos en ovisaco, I) las agallas contienen hembras ovipositoras, J) K) índice de agallamiento (Sánchez Portillo, 2010). .....	30
<b>Imagen 1.4:</b> a- Raíces de pimiento con agallas (Flechas rojas). b- Agallas con masas de huevos teñidas de rosa con fucsina acida (Flecha roja) (Imagen propia). .....	31
<b>Imagen 1.5:</b> Huevos de <i>Nacobbus aberrans</i> en 3 momentos del desarrollo del Juvenil del primer estadio (Garita, 2020). .....	31
<b>Imagen 1.6:</b> Juvenil de segundo estadio (J2) de <i>Nacobbus aberrans</i> (Imagen propia). .....	32
<b>Imagen 1.7:</b> Hembra madura de <i>Nacobbus aberrans</i> (Imagen propia). .....	33
<b>Imagen 1.8:</b> a- Machos de <i>Nacobbus aberrans</i> . b- Bursa bien desarrollada, característica típica de <i>N. aberrans</i> . c- Estilete. (Imagen propia). .....	33
<b>Imagen 1.9:</b> Plantas de tomate afectadas por <i>N. aberrans</i> en una producción bajo cubierta en el CHLP (Imagen propia). .....	34
<b>Imagen 1.10:</b> Clasificación de las micorrizas (Madrid et al., 2016) .....	38
<b>Imagen 1.11:</b> Raíces de <i>Rizophagus intraradices</i> teñidas con azul de tripan. A: arbusculos; H: Hifas; V: vesículas; E: esporas. (Imagen propia). .....	39
<b>Imagen 1.12:</b> Esporas de <i>Rhizophagus intraradices</i> en raíces de pimiento teñidas con fucsina acida (a) y azul de tripan (b) (Imagen propia). .....	40
<b>Imagen 1.13:</b> <i>Arthrobotrys oligospora</i> atrapando a un nematodo de vida libre (a) (Nordbring-Hertz, 2004) y a <i>Meloidogyne graminicola</i> (b) (Singh et al., 2012) .....	45
<b>Imagen 1.14:</b> <i>Panagrellus redivius</i> infectado con conidios del hongo nematófago endoparásito <i>Meria coniospora</i> (Jansson, 1982). .....	45

<b>Imagen 1.15:</b> Huevos de <i>N. aberrans</i> (a) y <i>Meloidogyne spp.</i> (b) parasitado por <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Gortari & Hours, 2019; Varela Benavides et al., 2016).....	46
<b>Imagen 1.16:</b> <i>Panagrellus sp.</i> (a) y <i>Poikilolaimus oxycercus</i> (b) inmovilizados por la toxina de <i>Pleurotus ostreatus</i> (Genier et al., 2015; Marlin et al., 2019). .....	46
<b>Imagen 1.17:</b> Colonia de <i>P. lilacinum</i> LPSC #876. (Imagen propia). .....	47
<b>Imagen 1.18:</b> a- Colonia de <i>P. ostreatus</i> en medio agar papa glucosado; b y c- Fructificación de <i>P. ostreatus</i> en sustrato de semillas de avena. (Imagen propia). ....	49
<b>Imagen 2.1:</b> a- Plantas de pimiento en speedling. b- Plantas de pimiento en macetas de 10 Kgs (Imagen propia). .....	74
<b>Imagen 2.2:</b> Raíces de pimiento inoculados y no inoculados con <i>N. aberrans</i> . A: Agallas. H: Huevos y juveniles (J) de <i>N. aberrans</i> . (Imagen propia). .....	80
<b>Imagen 2.3:</b> A-H. Corte transversal de raíz control (A-B) y de raíz con deformaciones por la presencia de agallas (C-H) y su patrón tisular. Nótese la presencia de nematodos en asociación a células corticales con granos de almidón. E: epidermis, Ex: exodermis, Pc: parénquima cortical, En: endodermis, Pe: periciclo, F: floema, X: xilema, Flecha roja: Presencia de nematodos (Imagen propia). .....	81
<b>Imagen 3.1:</b> Plantas trampa de <i>Lotus tenuis</i> y <i>Trifolium repens</i> para la producción de inóculo de micorrizas en cámara de crecimiento (Imagen propia). 98	
<b>Imagen 3.2:</b> Plantas de pimiento inoculadas y no inoculadas con las tres cepas de micorrizas en presencia y ausencia de <i>N. aberrans</i> . (Imagen propia). .....	100
<b>Imagen 3.3:</b> Raíces de pimiento teñidas con azul de tripan por el método de Phillips y Hayman, (1970) (Imagen propia). .....	101
<b>Imagen 3.4:</b> Portaobjetos con raíces teñidas con fucsina ácida para cuantificación por microscopio (Imagen propia).....	102
<b>Imagen 3.5:</b> Raíces de pimiento teñidas con azul de tripan (a y b) y con fucsina ácida (c y d). H: Hifas; V: Vesículas; N: Nematodos (Imagen propia).....	103
<b>Imagen 4.1:</b> Preparación de los inóculos <i>P. ostreatus</i> y <i>P. lilacinum</i> (Imagen propia). .....	121
<b>Imagen 4.2a.</b> Raíces de pimiento correspondientes a los tratamientos NI, PO, y PL en ausencia de <i>N. aberrans</i> . b- Raíces de pimiento correspondientes a los tratamientos NI, PO y PL en presencia de <i>N. aberrans</i> (Imagen propia).....	124

<b>Imagen 4.3:</b> a- En círculo rojo se muestra la presencia de una colonia de <i>P. lilacinum</i> . b y c- Tratamientos PO y NI sin presencia de colonias de las cepas utilizadas en el ensayo (Imagen propia). .....	129
<b>Imagen 5.1:</b> Plantas de pimiento inoculadas y no inoculadas con rizobacterias en presencia y ausencia de <i>N. aberrans</i> (Imagen propia). .....	138
<b>Imagen 5.2:</b> a- Plantas de pimiento sin inocular (NI) en presencia de <i>N. aberrans</i> (N1). b- Planta de pimiento sin inocular (NI) en presencia (N1) y ausencia (N0) de <i>N. aberrans</i> (Imagen propia). .....	143
<b>Imagen 6.1:</b> Plantas de pimiento inoculadas de forma individual y combinada con RI B1, PL y BT en ausencia y presencia de <i>N. aberrans</i> (Imagen propia). .....	146
<b>Imagen 6.2:</b> a- Frutos de pimiento. b- Frutos de pimiento pesados en balanza para medir rendimiento. (Imagen propia). .....	148
<b>Imagen 6.3:</b> A- Raíces del tratamiento control (NI) en ausencia y presencia de <i>N. aberrans</i> . B- Raíces del tratamiento inoculado con <i>Rhizophagus intraradices</i> (B1) en ausencia y presencia de <i>N. aberrans</i> . C- Raíces del tratamiento inoculado con <i>Purpureocillium lilacinum</i> (PL) en ausencia y presencia de <i>N. aberrans</i> . D- Raíces del tratamiento inoculado con <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki (BT) en ausencia y presencia de <i>N. aberrans</i> . E- Raíces del tratamiento inoculado con <i>Rhizophagus intraradices</i> B1 y <i>Purpureocillium lilacinum</i> (B1PL) en ausencia y presencia de <i>N. aberrans</i> . F- Raíces del tratamiento inoculado con <i>Rhizophagus intraradices</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki (B1BT) en ausencia y presencia de <i>N. aberrans</i> . G- Raíces del tratamiento inoculado con <i>Purpureocillium lilacinum</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki (PLBT) en ausencia y presencia de <i>N. aberrans</i> . H- Raíces del tratamiento inoculado con <i>Rhizophagus intraradices</i> B1, <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki y <i>Purpureocillium lilacinum</i> (B1PLBT) en ausencia y presencia de <i>N. aberrans</i> . .....	162
<b>Imagen 6.4:</b> Raíces de pimiento inoculadas con RI B1 en presencia de <i>N. aberrans</i> . H: Hifas; E: Espora; V: Vesículas (Imagen propia). .....	163
<b>Imagen 6.5:</b> Presencia de <i>P.lilacinum</i> en cultivos de suelos (en círculo rojo) de los tratamientos PL (a), B1PL (b), PLBT, NI, B1PLBT en orden de izq. a der. (c) (Imagen propia). .....	176

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1:</b> Altura, diámetro, peso seco aéreo y de raíz, y clorofila de plantas de pimiento no inoculadas (control) o inoculadas con <i>Nacobbus aberrans</i> (inoculado).....	82
<b>Tabla 2.2:</b> Fotosíntesis neta (PN), transpiración (E), conductancia estomática (G) y eficiencia en el uso de agua (EUA) de plantas de pimiento no inoculadas (control) o inoculadas con <i>Nacobbus aberrans</i> (inoculado).....	83
<b>Tabla 2.3:</b> Contenido de prolina (P), azúcares totales (A T), azúcares reductores (A R) y compuestos fenólicos (C F) de plantas de pimiento no inoculadas (control) o inoculadas con <i>Nacobbus aberrans</i> (inoculado).....	84
<b>Tabla 2.4:</b> Contenido de malonilaldehído (MDA), catalasas totales (CAT), peroxidasas totales (POX) y conductividad relativa de membranas (CR) de plantas de pimiento no inoculadas (control) o inoculadas con <i>Nacobbus aberrans</i> (inoculado).....	85
<b>Tabla 3.1:</b> Porcentaje de micorrización (%M) y viabilidad micorrícica (%SDH) de plantas de pimiento inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): <i>Funneliformis mosseae</i> (FM), <i>Rhizophagus intraradices</i> B1 (RI B1), y <i>Rhizophagus intraradices</i> A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo.....	104
<b>Tabla 3.2:</b> Número de huevos totales, número de huevos por gramo de peso fresco de raíz y factor de reproducción (Fr) de <i>N. aberrans</i> de plantas de pimiento inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): <i>Funneliformis mosseae</i> (FM), <i>Rhizophagus intraradices</i> B1 (RI B1), y <i>Rhizophagus intraradices</i> A2 (RI A2). .....	105
<b>Tabla 3.3:</b> Contenido de clorofila, carotenos, proteínas solubles en hojas y proteínas en raíces de plantas de pimiento inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): <i>Funneliformis mosseae</i> (FM), <i>Rhizophagus intraradices</i> B1 (RI B1) y <i>Rhizophagus intraradices</i> A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> en el suelo. ....	105
<b>Tabla 4.1:</b> Número de huevos totales, número de huevos/ gramos de raíz y Factor de reproducción de Oostenbrick de los tratamientos control (NI) y los tratamientos inoculados con <i>P. ostreatus</i> (PO) y <i>P. lilacinum</i> (PL) en presencia de <i>N. aberrans</i> ...	123
<b>Tabla 4.2:</b> Altura, diámetro del tallo y conductancia estomática (G) de planta de pimiento en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> y sin inocular (NI) e inoculadas con <i>P. ostreatus</i> (PO) y <i>P. lilacinum</i> (PL).....	124
<b>Tabla 4.3:</b> Contenido de clorofila, carotenos, proteínas de hojas y de raíz de plantas de pimiento en ausencia (N0) y presencia (N1) de <i>N. aberrans</i> y sin inocular (NI) e inoculadas con <i>P. ostreatus</i> (PO) y <i>P. lilacinum</i> (PL). ....	125

<b>Tabla 5.1:</b> Número de huevos totales y Factor de reproducción (Fr) de las plantas de pimiento tratadas con <i>Azospirillum brasilense</i> (AB), <i>Bacillus subtilis</i> (BS) y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki (BT) en presencia de <i>N. aberrans</i> .....	139
<b>Tabla 5.2:</b> Altura, diámetro del tallo, peso fresco y peso seco de las plantas de pimiento tratadas con <i>Azospirillum brasilense</i> (AB), <i>Bacillus subtilis</i> (BS) y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki (BT) en presencia (N1) y ausencia (N0) de <i>N. aberrans</i> .....	140
<b>Tabla 5.3:</b> Fotosíntesis neta (PN), transpiración (E), conductancia estomática (G) y eficiencia en el uso de agua (EUA) de las plantas de pimiento tratadas con <i>Azospirillum brasilense</i> (AB), <i>Bacillus subtilis</i> (BS) y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki (BT) en presencia (N1) y ausencia (N0) de <i>N. aberrans</i> . ....	143
<b>Tabla 5.4:</b> Contenido de clorofila, carotenos y proteínas solubles en hojas y raíces de las plantas de pimiento tratadas con <i>Azospirillum brasilense</i> (AB), <i>Bacillus subtilis</i> (BS) y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki (BT) en presencia (N1) y ausencia (N0) de <i>N. aberrans</i> . ....	144
<b>Tabla 6.1:</b> Número de huevos totales, huevos por gramo de raíz y factor de reproducción (Fr) de los tratamientos inoculados con <i>Purpureocillium lilacinum</i> (PL), <i>Rhizophagus intraradices</i> (B1), <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki (BT) y las combinaciones de los tres en presencia de <i>N. aberrans</i> .....	159
<b>Tabla 6.2:</b> Porcentaje de micorrización (% M), porcentaje de vesículas (% V), porcentaje de arbuscúlos (% A) y porcentaje de hifas (% H) de plantas de pimiento inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> (B1) y su combinación con <i>Purpureocillium lilacinum</i> (PL), y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki (BT) en presencia (N1) y ausencia de <i>N. aberrans</i> (N0). ....	163
<b>Tabla 6.3:</b> Altura, diámetro del tallo y peso seco total (PST) de plantas de pimiento inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> (B1) y su combinación con <i>Purpureocillium lilacinum</i> (PL), y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki (BT) en presencia (N1) y ausencia de <i>N. aberrans</i> (N0). ....	164
<b>Tabla 6.4:</b> Conductancia estomática (G), transferencia de electrones (ETR), rendimiento máximo del fotosistema II (Fv/Fm) de plantas de pimiento inoculadas y no inoculadas con <i>Purpureocillium lilacinum</i> (PL), <i>Rhizophagus intraradices</i> (B1), <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki (BT) y las combinaciones de los tres en presencia (N1) y ausencia de <i>N. aberrans</i> (N0).....	166
<b>Tabla 6.5:</b> Efecto de la inoculación con <i>Purpureocillium lilacinum</i> (PL), <i>Rhizophagus intraradices</i> (B1), <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki (BT) y la combinación de los tres	

microorganismos en el número y el peso de frutos totales de cada tratamiento en presencia (N1) y ausencia de *N. aberrans* (N0). ..... 175

## ABREVIATURAS

APG: Agar papa glucosado (medio de cultivo).

CABI: Centre for Agricultural Bioscience International (Centro de Biociencia Agrícola Internacional).

CAT: Catalasa

CHLP: Cinturon Hortícola de La Plata.

CR: Conductividad relativa de membranas celulares.

E: Transpiración.

EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization (Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria).

ETR: Transferencia de electrones.

EUA: Eficiencia en el uso del agua.

Fr: Factor de reproducción de Oostenbrick.

G: Conductancia estomática.

HMA: Hongos micorrizicos arbúsculares.

MA: Micorrizas arbúsculares

MDA: Malonildialdehido.

PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria): Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

PN: Fotosíntesis neta.

POX: Peroxidasa.

PSII: Rendimiento cuántico del fotosistema II.

SDH: Viabilidad micorrizica.

## RESUMEN

Los nematodos noduladores de la raíz afectan a una gran diversidad de cultivos de importancia económica. Suelen ser un factor limitante en la producción de tomate y pimiento, y su incidencia se incrementó en los últimos años fundamentalmente en los cultivos bajo invernadero. El Cinturón Hortícola de La Plata (CHLP), localizado en la periferia de la ciudad de La Plata, constituye el área productiva más importante del Cinturón Verde Bonaerense. El 100% de la producción en el Partido de La Plata tiene como destino el consumo en fresco. Los géneros de nematodos más importantes en esta zona son *Meloidogyne* y *Nacobbus*. Ambos inducen la formación de agallas en la raíz dificultando la absorción de agua y nutrientes lo que se traduce en pérdidas productivas que pueden alcanzar la totalidad del cultivo. *Nacobbus aberrans* es una especie originaria de América del Sur, y reconocida como plaga cuarentenaria en Europa y EEUU. Posee un amplio rango de hospederos y tiene la capacidad de permanecer latente en condiciones desfavorables para su desarrollo. El control de esta plaga se basa en el uso de desinfectantes de suelo (i.e. bromuro de metilo) y otros nematicidas químicos. El primer objetivo específico de la tesis fue evaluar las respuestas morfofisiológicas y bioquímicas que produce el parasitismo por *N. aberrans* en plantas de pimiento, para ello se llevó a cabo un ensayo en condiciones controladas bajo invernáculo. Se pudieron observar alteraciones en los vasos de conducción, con formación de síncitos, células parenquimales desordenadas y acumulación de gránulos de almidón. Las plantas infectadas tuvieron mayor acumulación de osmolitos, mayor peroxidación de lípidos, liberación de electrolitos y actividad enzimática indicando un daño por estrés. A su vez el contenido de proteínas foliares y clorofila fue mayor en plantas control que en las infectadas. En cuanto a los parámetros de crecimiento no se observaron diferencias a excepción de peso seco total. También hubo una disminución en los parámetros fisiológicos en plantas afectadas por el nematodo correlacionándose con el agallamiento en las raíces, lo que afectó la absorción de agua y nutrientes. Los siguientes objetivos específicos fueron analizar el potencial de diferentes hongos y bacterias en el control de nematodos noduladores y evaluar la respuesta a la inoculación con microorganismos benéficos en plantas de pimiento crecidas en presencia de *N. aberrans*, utilizando parámetros bioquímicos y morfofisiológicos. Se probaron tres hongos formadores de micorrizas arbusculares, *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus intraradices* A2 y *Rhizophagus intraradices* B1; dos hongos nematófagos, *Pleurotus ostreatus* y *Purpureocillium lilacinum*; y tres rizobacterias, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* y *Azospirillum brasilense*. Los resultados mostraron que hubo una atenuación del estrés en las plantas que estaban infestadas por *N. aberrans* e inoculadas tanto con

hongos micorrícicos arbusculares y hongos nematófagos, evidenciado por una reducción en la población de nematodos, menor contenido de prolina, compuestos fenólicos y menor conductividad relativa de membranas (CR). También se pudo observar que estos hongos tuvieron un efecto promotor del crecimiento vegetal. Las plantas inoculadas con hongos micorrícicos mostraron alrededor del 50 % de colonización, siendo mayor en aquellas plantas micorrizadas en presencia de *N. aberrans*. Se evaluó la persistencia de los hongos nematófagos *P. ostreatus* y *P. lilacinum* en el suelo una vez finalizado el ensayo, tomando muestras de suelo. A partir de partículas del suelo aplicadas en medio agarizado, se detectaron colonias de hongos correspondientes a *P. lilacinum* luego del período de incubación, evidenciando que el inóculo de partida persiste en el suelo durante todo el ciclo del cultivo. En cuanto al ensayo comparativo de rizobacterias los resultados mostraron un buen comportamiento de *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, disminuyendo notablemente la población de *N. aberrans*. En cuanto a los parámetros de crecimiento no mostraron diferencias significativas. El contenido de clorofila y proteínas fue menor en el tratamiento inoculado sólo con *N. aberrans*, siendo mayor el contenido en las plantas sin parasitar y las plantas parasitadas y tratadas con las bacterias. El contenido de osmolitos fue menor en los tratamientos inoculados con bacterias en presencia del nematodo, al igual que la CR tanto en hojas como en raíz. Los parámetros fisiológicos disminuyeron en el tratamiento infectado con *Nacobbus aberrans* con respecto a los tratamientos sin nematodos y los tratamientos inoculados con *N. aberrans* y bacterias. Tanto *B. subtilis* y *B. thuringiensis* se pueden considerar factibles de utilizar para reducir la población de *N. aberrans*. Para el último objetivo específico se seleccionaron, de los ensayos previos, a los microorganismos que mostraron mejor comportamiento antagonista sobre *N. aberrans* no sólo para reducir su población en el suelo rizosférico sino también por ejercer un efecto promotor del crecimiento vegetal e inducir mecanismos de defensa en la planta, y se analizó si su combinación es efectiva como antagonista del nematodo. Éstos microorganismos fueron *R. intraradices* B1, *P. lilacinum* y *B. thuringiensis* var *kurstaki*. Los resultados obtenidos mostraron mayor contenido de clorofila en los tratamientos en ausencia del nematodo. En presencia del nematodo e inoculados individualmente como combinados los microorganismos benéficos presentaron los valores más altos. Similares tendencias se observaron en peso seco aéreo y de raíz. La conductividad relativa de membranas de hojas y de raíz, mostró los porcentajes más bajos en aquellos tratamientos inoculados con los microorganismos. Misma tendencia se registró al medir el rendimiento máximo del fotosistema II (PSII) y la transferencia de electrones (ETR). En cuanto al porcentaje de micorrización, éste no fue afectado por la presencia de nematodos, al igual que por los otros microorganismos al combinarlos. Lo mismo

sucedió al evaluar la persistencia de *P. lilacinum* en el suelo, esta no se vió afectado por las combinaciones. El número de huevos totales disminuyó significativamente en todos los tratamientos inoculados tanto individualmente como combinados por los microorganismos benéficos comparando con el tratamiento control. Teniendo en cuenta la reducción de la población y la atenuación del estrés, la combinación entre *Rhizophagus intraradices* B1 y *P. lilacinum* tuvo mejor comportamiento lo que puede sugerir el establecimiento de una interacción sinérgica.

Si bien se demostró que estos hongos, tanto individualmente como combinados, mejoran el crecimiento de las plantas de pimiento bajo condiciones controladas de invernáculo, incluyendo la reducción de la infestación por *N. aberrans*, son necesarios futuros estudios bajo condiciones de campo para validar a estos hongos como agentes de control biológico y biofertilizante con aplicación en la producción hortícola de pimiento en el CHLP.

## ABSTRACT

False root-knot nematodes affect a wide variety of economically important crops. Their incidence has increased in recent years, being a limiting factor in tomato and pepper greenhouse production. La Plata Horticultural Belt (LPHB) is located on the outskirts of La Plata city and constitutes the most important production area of the Buenos Aires Green Belt. All of the production in this zone is destined for fresh consumption. *Meloidogyne* spp. and *Nacobbus aberrans* are the most important nematode genres. Both induce galls formation in the roots, hindering water and nutrient absorption, which translates into productive losses that can reach the entire production. *Nacobbus aberrans* is a South American native species and is recognized as a quarantine pest in Europe and the USA. It has a wide range of hosts and has the ability to remain dormant in unfavorable conditions for its development. Its control was based on the use of soil disinfectants (i.e. methyl bromide) and chemical nematicides. The first objective of this thesis was to evaluate the morphophysiological and biochemical responses produced by *N. aberrans* parasitism in pepper plants, for which an experiment was carried out under greenhouse-controlled conditions. Alterations in the conduction vessels, syncytia formation, disordered parenchymal cells and starch granules accumulation were observed. Infected plants had higher osmolyte accumulation, lipid peroxidation, electrolyte release, and enzymatic activity indicating stress damage. In addition, leaf proteins content and chlorophyll were higher in control plants than in infected ones. Regarding growth parameters, no differences were observed, except for total dry weight. Also, there was a decrease in physiological parameters in nematode-affected plants, correlated with root galling. The next objectives were to analyze different fungi and bacteria control of root-knot nematodes potential and to evaluate the response of beneficial microorganisms inoculation in pepper plants growing in *N. aberrans* presence, via biochemical and morphophysiological parameters. Three arbuscular mycorrhizal fungi, *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus intraradices* A2 and *Rhizophagus intraradices* B1; two nematophagous fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Purpureocillium lilacinum*; and three rhizobacteria, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, and *Azospirillum brasilense* were tested. The results showed the attenuation of stress in plants infested by *N. aberrans* when they were inoculated with both arbuscular mycorrhizal fungi and nematophagous fungi, evidenced by a reduction in nematodes population, lower proline content, phenolic compounds and lower membrane relative conductivity (RC). Also, these fungi had a plant growth-promoting effect. Mycorrhizal fungi inoculated plants showed around 50% colonization, values being higher in the presence of *N. aberrans*. Soil persistence of the nematophagous fungi *P. ostreatus* and

*P. lilacinum* was evaluated once the test was finished, using soil samples. Fungal colonies corresponding to *P. lilacinum* were detected from soil particles applied to agar medium after the incubation period, showing that the initial inoculum persists in the soil throughout the crop cycle. In the comparative test of rhizobacteria, the results showed a good performance of *B. subtilis* and *B. thuringiensis*, notably decreasing the population of *N. aberrans*. Growth parameters did not show significant differences. Chlorophyll and proteins contents were lower in the treatment inoculated only with *N. aberrans*, increasing in plants without parasitizing and parasitized plants treated with bacteria. The osmolyte content was lower in the bacteria-inoculated treatments with bacteria with nematode presence, as well as the RC in leaves and roots. The physiological parameters values decreased in *N. aberrans* infected treatments concerning the treatments without nematodes and the treatments inoculated with bacteria and infected with *N. aberrans*. *B. subtilis* and *B. thuringiensis* can be used to reduce *N. aberrans* populations. For the last objective, the microorganisms from each experiment that showed the best performance, not only to reduce the *N. aberrans* population but also to exert a growth-promoting effect and induce defense mechanisms in plants were selected, in order to analyze if the combination of these studied microorganisms reduces the antagonistic effect of *N. aberrans* and to investigate possible mechanisms of interaction. The results showed a higher chlorophyll content in the treatments in the absence of nematodes. In the presence of the nematode, the beneficial inoculated microorganisms, both individually or combined, presented the highest values. Similar trends were observed in aerial and root dry weights. The relative conductivity of leaf and root membranes showed the lowest percentages in those treatments inoculated with microorganisms. The same trend was observed when measuring the maximum performance of photosystem II (PSII) and electron transfer (ETR). Regarding the percentage of mycorrhization, it was not affected by the presence of nematodes, as well as by the other microorganisms when combined. The same thing occurred with the persistence of *P. lilacinum* in the soil, which was not affected by the combinations. The number of total eggs decreased significantly in all treatments inoculated with beneficial microorganisms, both individually and combined, compared to the control treatment. Taking into account the population reduction and attenuation of stress, the combination between *R. intraradices* B1 and *P. lilacinum* performed better, suggesting the establishment of a synergistic interaction. Although these microorganisms, both individually and in combination, could be applied as a biological control agent and biofertilizer to enhance growth and reduce *N. aberrans* infestation, there is still a long way to go. More research is needed on these combinations and their application in field conditions with all the variables involved in horticultural production. But they are still feasible biological tools to be used by producers in the area.

## Publicaciones vinculadas a esta Tesis doctoral

**IV CAMAYA. IV Congreso Argentino de Microbiología** realizado en la ciudad de Mar del Plata del 11 al 13 de abril del 2018. Presentación de poster: Evaluación de la inoculación a la siembra con diferentes hongos promotores del crecimiento como bioinsumos en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.).

**Bernardo, Valeria**; Garita, Sebastián; Ripodas, Juan; Gonzalez, Matias; Arango, Cecilia; Saparrat, Mario; Ruscitti, Marcela.

**35 Congreso Brasileiro de Nematologia** realizado en Bento Goncalves, Rio Grande do Sul, Brasil del 24 al 29 de junio del 2018. Presentación de poster: FUNGOS NEMATOFAGOS QUE REDUZEM A POPULAÇÃO DE *Nacobbus aberrans* E ESTIMULAM O CRESCIMENTO EM PLANTAS DE PIMENTÃO.

**Bernardo, Valeria**; Garita, Sebastian; Rípodas, Juan Ignacio; Arango, Maria Cecilia; De Lillo, Tobías; Ruscitti, Marcela

**VI Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales II Jornadas Nacionales de Plantas Medicinales Nativas.**

Ripodas, J.I.; Garita, S.; **Bernardo, V.**; Ruscitti, M.; Arango M.C., Hernández, M. P. Efecto de la aplicación in vitro de aceites esenciales sobre *Nacobbus aberrans* y *Paecilomyces lilacinus*. 26, 27 y 28 de noviembre de 2018. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Buenos Aires.

**II International Symposium Mycorrhizal Symbiosis in South America.** Del 6 al 8 de marzo del 2019. San Carlos de Bariloche, Rio Negro, Argentina. Use of arbuscular mycorrhizae for phytoparasitic nematodes control and growth promotion in pepper plants.

M. Ruscitti, C. Arango, S. Garita, **V. Bernardo** and J. Ripodas.

**36 Congreso Brasileiro de Nematologia** realizado en Caldas Novas, Goias, Brasil del 26 al 30 de mayo del 2019. Presentación de poster: MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ALTERATIONS IN PEPPER PLANTS (*Capsicum annum* L.) INFECTED WITH THE NEMATODE.

**Bernardo, V.**; Garita, S.; Arango, C.; Ripodas, J.I.; Ruscitti, M.

**36 Congreso Brasileiro de Nematologia** realizado en Caldas Novas, Goias, Brasil del 26 al 30 de mayo del 2019. Presentación de poster: RIZOBACTERIAS DISMINUYEN LA ECLOSIÓN Y LA MOVILIDAD DE *Nacobbus aberrans*.

Ripodas, J.I.; **Bernardo, V.**; Garita, S.; Arango, C.; Ruscitti, M.

**XXXVII Jornadas Argentina de Botánica** realizado en la Tucumán, Argentina del 9 al 13 de septiembre del 2019. Presentación de poster: Estudio de la relación entre el daño en raíces producido por *Nacobbus aberrans* y su efecto en parámetros fisiológicos, en plantas de *Capsicum annuum* L. (Solanaceae).

Ruscitti, M.; **Bernardo, V.**; Hernandez, M.P.; Garita, S.; Ripodas, J.; Plouganou, L y Arango, C.

**X Congreso Latinoamericano de Micología.** Expositora del simposio “Bioinsumos fúngicos para el manejo de nematodos fitoparásitos” con la charla “Hongos productores de compuestos con actividad nematostática y nematicida” realizada el día 14 de diciembre del 2020.

**XXXIII Argentinian Meeting of Plant Physiology RAFV 2021 13 al 17 de septiembre de 2021..** “Antagonistic activity of rhizobacteria against *Nacobbus aberrans* in pepper plants”.

**Valeria Bernardo**, Sebastian Garita, María Cecilia Arango, Mario Saparrat, Marcela Ruscitti.

Arbuscular mycorrhizal fungi against the false root-knot nematode activity in *Capsicum annuum*: physiological responses in plants. **Valeria Fernanda Bernardo**, Sebastian Andrés Garita, Maria Cecilia Arango, Juan Ignacio Ripodas, Mario Carlos Nazareno Saparrat & Marcela Fabiana Ruscitti. *Biocontrol Science and Technology*, vol 31, p. 1-13. 2020.

CAPÍTULO 4 Micorrizas arbusculares, aplicaciones en el sector agro-forestal. **Bernardo, V.**, Garita, S., Ripodas, J. I., Gonzalez, M., Arango, C., & Ruscitti, M. En: *Micorrizas arbusculares. Biología y aplicaciones en el sector agro-forestal*. 2020.

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1.1- NEMATODOS FITOPARÁSITOS: CONTEXTO

Los nematodos son organismos multicelulares que se encuentran presentes en los agroecosistemas donde pueden encontrarse en densidades superiores a 30 millones/m<sup>2</sup> (Andrés, 2003). Algunas especies atacan y parasitan animales y al hombre, y pueden causar distintas enfermedades. El resto, según sus hábitos alimentarios se pueden clasificar en varios grupos tróficos: saprófagos, omnívoros, depredadores, y fitoparásitos. Aunque todos ellos pueden ejercer cierto impacto en la producción agrícola, los nematodos fitoparásitos constituyen el grupo más importante por su acción patogénica (Andrés, 2003). Se han identificado más de 4.100 especies de nematodos parásitos de plantas (Decraemer & Hunt, 2006) aunque continuamente se encuentran nuevas especies (Mitiku, 2018). Las pérdidas de cultivos anuales estimadas debido a nematodos fitoparásitos en la producción agrícola mundial se aproxima al 11% y las pérdidas económicas anuales se calculan en torno a los 80 billones de dólares (Andrés, 2003; Agrios, 2005).

Los nematodos fitoparásitos se caracterizan por tener estiletes que sobresalen de la cavidad bucal que utilizan para penetrar en las células y así alimentarse, y en el caso de los endoparásitos, permite su entrada en la planta huésped. Algunos nematodos son ectoparásitos migratorios (p. ej., *Xiphinema spp.*) que no ingresan a la planta huésped, simplemente migran a través del suelo, utilizando las raíces como fuente de alimento. Los endoparásitos migratorios (p. ej., *Radopholus spp.* y *Pratylenchus spp.*) ingresan al hospedador y migran inter o intracelularmente mientras se alimentan de las células, lo que provoca un daño extenso en los tejidos vegetales. Los nematodos semiendoparásitos pueden tener etapas migratorias, pero también penetran parcialmente en la planta huésped para alimentarse en una etapa del ciclo de vida. Sin embargo, los nemátodos económicamente más importantes son los agalladores (p. ej., *Nacobbus spp.* y *Meloidogyne spp.*) y los formadores de quiste (p. ej., *Heterodera spp.*) (Imagen 1.1). Estos son biótrofos e inducen estructuras complejas de alimentación en las raíces de sus huéspedes que suministran al nematodo una fuente de alimento (Sincito) (Gheysen & Mitchum, 2011; Jones *et al.*, 2013) (Figura 1.1).

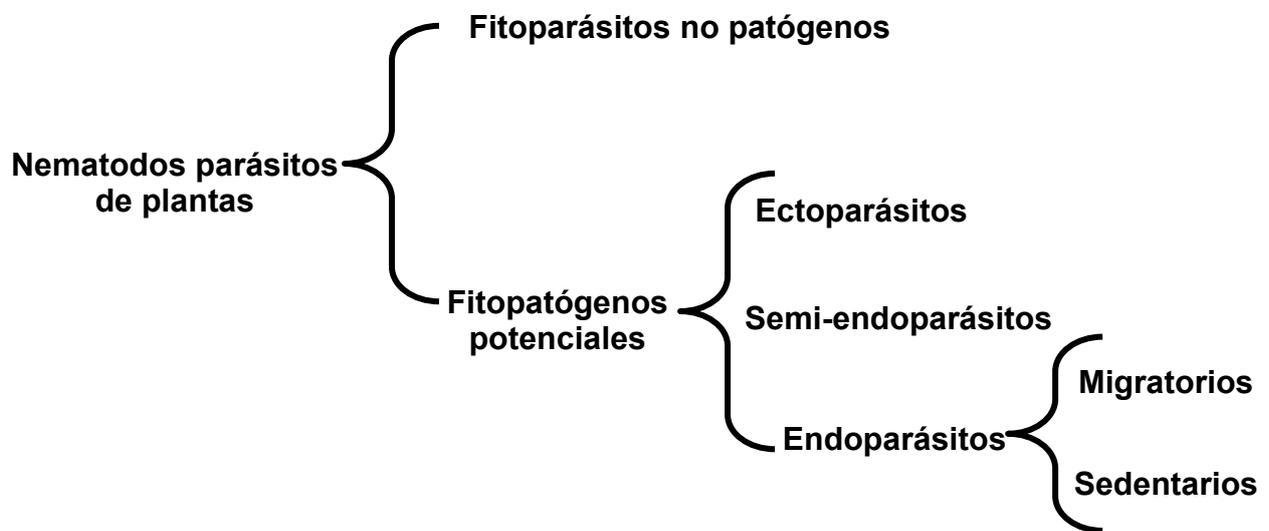


Figura 1.1: Clasificación de nematodos fitoparásitos.



Imagen 1.1: Formas de parasitismo de géneros reportados de nematodos parásitos de raíces (Siddiqui, 2000).

A nivel mundial se ha documentado sobre distintos nematodos que, según las pérdidas ocasionadas en la producción agrícola se los considera las especie económicamente más relevantes (Jones *et al.*, 2013). Dentro de estos nematodos se destacan:

- 1- *Meloidogyne spp.*: Son parásitos vegetales obligados que se distribuyen por todo el mundo. El género consta de 98 especies y parasitan a casi todas las especies de plantas vasculares. Las especies más importantes son *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, y *M. hapla*.
- 2- Nematodos del quiste o cisto (*Heterodera spp.* y *Globodera spp.*): Son biotrofos obligados y tienen una gran importancia económica en el mundo. Las especies más dañinas incluyen *Heterodera glycines* en soja, *Globodera pallida* y *G. rostochiensis* en papa, *Heterodera avenae* y *H. filipjevi* en cereales. Se ha calculado que *H. glycines* es responsable de pérdidas en soja de más de 1.500 millones de dólares cada año solo en EE. UU. (Chen *et al.*, 2001). En cereales puede superar el 90% de pérdidas (Nicol *et al.*, 2011) y se ha estimado que causan pérdidas del 9% de la producción total de papa en el mundo (Turner & Rowe, 2006).
- 3- *Pratylenchus spp.*: Hay más de 60 especies identificadas que se distribuyen en todo el mundo. Las especies de *Pratylenchus* ocupan el tercer lugar luego de los nematodos agalladores y del quiste que tienen el mayor impacto en los cultivos en el mundo (Castillo & Volvas, 2007). Las más importantes de ellas son *P. penetrans*, *P. thornei*, *P. neglectus*, *P. zaeae*, *P. vulnus* y *P. coffeae*.
- 4- El nematodo barrenador *Radopholus similis*: es un nematodo endoparásito migratorio que se sabe que es una plaga destructiva de cultivos de cítricos, pimiento y, lo más importante, banano. El nematodo causa pérdidas económicas en todo el mundo, sobre todo en las regiones más cálidas, como América del Sur, el Caribe, África, Asia y el Pacífico.
- 5- *Ditylenchus dipsaci*: El género *Ditylenchus* tiene más de 60 especies descritas, pero solo unas pocas son parásitos de plantas superiores (Duncan & Moens, 2006). La especie más conocida del género es *D. dipsaci*, en parte debido a su amplia gama de hospedadores y en parte debido a su asombrosa capacidad para sobrevivir a la desecación severa. *Ditylenchus dipsaci* es un endoparásito migratorio, comúnmente conocido como el nematodo "tallo" o "tallo y bulbo", y se distribuye en todo el mundo, especialmente en regiones templadas. Es plaga cuarentenaria en muchos países afectando principalmente ajo y cebolla.
- 6- *Bursaphelenchus xylophilus*: El nematodo del marchitamiento del pino es un nematodo endoparásito migratorio originario de América del Norte. Las pérdidas económicas en plantaciones forestales son significativas, con pérdidas de  $2 \times 10^6$

m<sup>3</sup> de madera en condiciones ambientales favorables (Nose & Shiraishi, 2007). También puede causar devastación a escala de ecosistema, ya que todos los árboles infectados en un área pueden morir cuando las condiciones son adecuadas para la enfermedad. La prevención de la propagación de *B. xylophilus* es particularmente difícil ya que el nematodo es vectorizado a nuevos huéspedes por la etapa adulta (voladora) de *Monochamus*.

- 7- *Rotylenchulus reniformis*: El nematodo reniforme, es un semiendoparásito sedentario, afecta a una gran cantidad de especies de plantas anuales y perennes. El daño a los cultivos causado por *R. reniformis* está muy extendido en zonas tropicales y subtropicales. Tiene un amplio rango de hospederos, más de 350 especies de plantas, incluidas muchas de importancia económica como hortalizas, frutales, ornamentales y cultivos de fibra, así como también malezas.
- 8- *Xiphinema index*: Es un ectoparásito importante de la vid y tiene una gran distribución a nivel mundial. Los cultivos hospederos económicamente importantes son la vid y la higuera. A su vez actúa como vector de Grapevine virus fan leaf (GFLV) (Hewitt *et al.*, 1958), uno de los virus más importantes que afecta a la producción de vid (Jelly *et al.*, 2012).
- 9- *Aphelenchoides besseyi*: Es un nematodo foliar que afecta numerosas plantas, principalmente el arroz causando la enfermedad de la "punta blanca" llegando a causar pérdidas estimadas de \$ 16 mil millones en daños en ese cultivo (Lilley *et al.*, 2011). Estos nematodos foliares se alimentan como ecto y endoparásitos de las partes de la planta por encima del suelo.
- 10- ***Nacobbus aberrans***: El género *Nacobbus*, el falso nematodo agallador, es endémico de Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador, México, Perú y Estados Unidos. Los juveniles y adultos inmaduros son migratorios y vermiformes, y las hembras maduras son sedentarias y globosas. *Nacobbus aberrans* sensu lato (EPPO, 2019) es polífago con 18 familias botánicas y 84 especies reportadas como hospedantes. La pérdidas de rendimiento reportadas para *N. aberrans* son en promedio 65% para papa andina en América Latina, 55% y 36% para tomate y poroto, respectivamente, en México y 10-20% para remolacha azucarera en EE.UU., pero, para la mayoría de los cultivos, faltan estimaciones de pérdidas (Manzanilla-López *et al.*, 2002). A lo largo de este trabajo se ahondará más en esta especie que es el objeto de estudio de esta tesis.

En Argentina se distribuyen algunos nematodos fitoparásitos que afectan distintos cultivos y ocasionan pérdidas económicas importantes. Los nematodos más importantes debido a su incidencia, cultivos que afectan y su complicado control son los siguientes:

- *Nacobbus aberrans*: Especie polífaga que afecta a numerosos cultivos hortícolas, papa y malezas, lo que hace que esté ampliamente distribuido en el país y hace más difícil su control. En el caso de la papa y varios cultivos hortícolas, ocasiona serios daños a las plantas pudiendo disminuir sensiblemente su producción (Doucet, 1997). En un estudio morfométrico y molecular realizado por Lax *et al.*, 2021, lograron identificar tres especies de *Nacobbus*: *Nacobbus aberrans* s.s., *Nacobbus bolivianus* y *Nacobbus celatus*. Este último es el que se encuentra en la mayor parte del suelo de Argentina incluída la ciudad de La Plata. Durante la tesis se lo seguirá nombrando como *N. aberrans*.
- *Meloidogyne spp.*: Hasta el momento han sido detectadas nueve especies, siendo *M. incógnita* y *M. arenaria* las especies con mayor dispersión en el país. Es una especie polífaga que tiene un elevado potencial reproductivo afectando cultivos hortícolas, papa, soja y malezas. Los problemas de mayor importancia ocurren en cultivos hortícolas (especialmente tomate y pimiento) y soja (Doucet 1997)
- *Heterodera glycines.*: El nematodo del quiste de la soja es un endoparásito sedentario que no genera agallas sino quistes y tiene un elevado potencial reproductivo. Se concentra en la zona núcleo de producción, Tucumán y Chaco (zona sojera).
- *Pratylenchus spp.*: El nematodo lesionador de la raíz es un nematodo polífago con elevado potencial reproductivo. Tiene una amplia distribución en el país en zonas cultivadas y no cultivadas. Puede causar importantes daños en determinados cultivos principalmente hortícolas (Doucet 1997).
- *Ditylenchus dipsaci*: Es un endoparásito migrador que ataca bulbos y tallos. Tiene un elevado potencial reproductivo, amplios rangos de hospederos, principalmente hortícolas (ajo), florícolas y ornamentales. La mayor parte del tiempo los cultivos no presentan síntomas, a menos que exista una gran infestación (Doucet, 1997).
- *Xiphinema spp.*: Nematodo de la daga, es un nematodo ectoparásito migrador. Tiene un regular potencial reproductivo y un rango de hospederos variado. En el país se encuentran *X. americanum* y *X. index*, este último es vector del virus de la hoja en abanico en viñedos (Grape Fanleaf Virus, GFLV), lo que provoca pérdidas económicas en las zonas vitivinícolas, principalmente Mendoza (Doucet, 1997).

Como se mencionó anteriormente esta tesis se centra en el estudio de *Nacobbus aberrans*, una de las principales plagas que afectan a los cultivos del Cinturón Hortícola de La Plata (CHLP) como el pimiento. La misma se basa en la escasa información que hay sobre el parasitismo de este nematodo en el cultivo de pimiento y las respuestas morfofisiológicas y de defensa del mismo. A su vez se enfoca en el estudio de potenciales microorganismos nematicidas para su control.

### **Cinturón Hortícola de La Plata.**

La horticultura en Argentina se caracteriza por tener una amplia distribución geográfica, por la diversidad de especies que produce, y por su gran capacidad para satisfacer la demanda interna. La producción es mayoritariamente de origen familiar en unidades de producción con una superficie media de 5,1 ha que se llaman "Quintas" (Colamarino *et al.*, 2006; Stavisky, 2010; García, 2012). Otra característica importante es que es una gran fuente de empleo, (350.000 personas sólo en el eslabón productivo), y en una superficie de 600.000 hectáreas logra una producción anual que supera los 10.000.000 de toneladas (Colamarino *et al.*, 2006).

El Cinturón Hortícola de La Plata (CHLP), localizado en la periferia de la ciudad de La Plata, constituye el área productiva más importante del Cinturón Verde Bonaerense con el 46,15% de la superficie productiva total y el 25,15% de la superficie hortícola total de la Provincia de Buenos Aires (Imagen 1.2). El 100% de la producción en el Partido tiene como destino el consumo en fresco, abasteciendo de hortalizas frescas al área metropolitana comprendida por más de 13 millones de habitantes (INDEC, 2010). Los principales cultivos en orden decreciente de superficie plantada son lechuga, tomate y pimiento (Del Pino, 2016).



**Imagen 1.2:** Ubicación del Cinturón Hortícola de La Plata, Provincia de Buenos Aires (Argentina) (Alonso *et al.*, 2016).

*Capsicum annuum* L. conocido en Argentina como “Morrón”, pertenece a la familia Solanáceas. Es una planta herbácea, perenne, de cultivo generalmente anual y porte variable, entre los 0,5 metros (en determinadas variedades de cultivo al aire libre) y más de 2 m (híbridos cultivados en invernadero). Tiene un sistema radicular pivotante y profundo que puede llegar hasta 1,2 m y provisto de un número elevado de raíces adventicias superficiales. El patrón de crecimiento es simpodial que se mantiene mientras las condiciones ambientales lo permitan. El fruto es una baya hueca y semicartilaginosa, de color forma y tamaño diversos (Del Pino, 2016). Los suelos más adecuados para su cultivo son profundos, con buen drenaje y pH 7. Es medianamente tolerante a la salinidad: a partir de 2,5 ms/cm de CE ocurren importantes pérdidas de rendimiento (Del Pino, 2016).

Con respecto a la ecofisiología, la germinación se produce entre 20-25 °C. El crecimiento vegetativo posee temperatura base de 10°C y demanda entre un 50-70% de humedad relativa. La inducción floral es por suma térmica y la diferenciación responde a la amplitud térmica (Del Pino, 2016).

En el CHLP el 40% de la superficie se destina a cultivos protegidos (invernaderos) y el resto está ocupado por cultivos a campo (Stavisky, 2010). La incorporación del invernáculo en la horticultura platense comenzó en los '90 lo que trajo aparejado varias ventajas comparado con el cultivo a campo, como la posibilidad de reducir tiempos

muerdos, ampliar el período de producción de cada cultivo (siembras más tempranas y cosechas más tardías) logrando en algunos cultivos una mayor cantidad de ciclos productivos por unidad de tiempo por ende una mayor productividad. A su vez se logra un uso más eficiente de los medios de producción (capital y tierra) y de la fuerza de trabajo por lo cual el proceso productivo se hace económicamente más eficiente y más eficaz, en forma técnica (García, 2015). En este modelo tecnológico al ser muy simplificado y no contar con gran biodiversidad, se alteran procesos ecológicos esenciales, como la regulación de plagas y enfermedades, la polinización y la descomposición de residuos, y por lo tanto, deben ser reemplazados por insumos externos lo cual hace que el sistema tenga una alta demanda y dependencia de agroquímicos (Blandi *et al.*, 2015).

Una de las plagas que se hicieron predominantes en el CHLP son los nematodos fitoparasitos, no sólo por la utilización de cobertura plástica que aumenta la temperatura del ambiente, sino también debido a la falta de rotación de cultivos en los invernaderos como las Solanaceas que son hospederos de ciclo largo y son buenos hospedadores del nematodo, además de períodos cortos de barbecho lo que contribuye a crear un ambiente aún más propicio para la reproducción del patógeno (Garita, 2020).

Durante un largo período *Meloidogyne sp.* fue el nematodo fitoparásito con mayor incidencia en el Cinturón Hortícola de La Plata por sobre *N. aberrans* (Moreno, 1961). Sin embargo, en la actualidad hay un marcado predominio de *N. aberrans* sobre *Meloidogyne sp.* siendo responsable de más del 80 % de los síntomas de agallamiento observados en plantas hortícolas de la región convirtiéndose en la principal adversidad fitosanitaria presente en el CHLP en la actualidad (Nico, 2014; Garita, 2020).

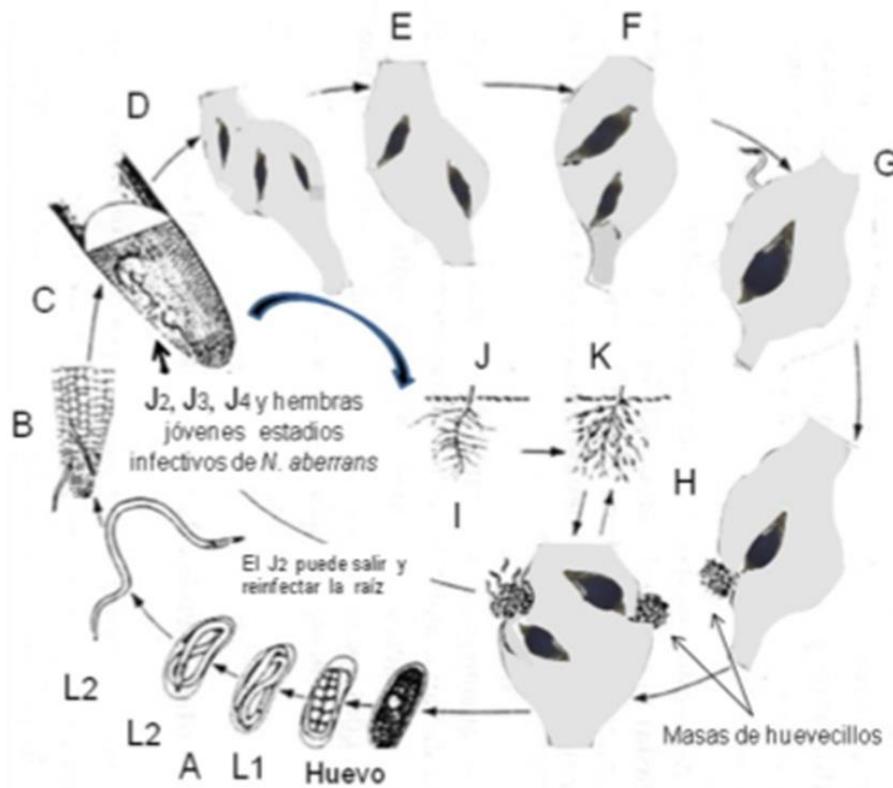
## **1.2- *Nacobbus aberrans***

*Nacobbus aberrans* es una especie originaria de América del Sur, y reconocida como plaga cuarentenaria en Europa y EEUU (EPPO, 2011). Se encuentra bajo regulaciones fitosanitarias internacionales para evitar su introducción en otros países (CABI & EPPO, 1997). Se han propuesto tres grupos basados en el rango de hospederos: remolacha azucarera, papa y poroto (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Estos grupos (también conocidos como razas) se han simplificado, pero todavía se utilizan con fines de cuarentena. *Nacobbus aberrans* sensu lato del grupo de la papa se considera uno de los patógenos vegetales más importantes de América del Sur, y al menos 40 países han implementado medidas de cuarentena para prevenir su introducción (Jones *et al.*, 2013). Una de las características de este nematodo es que presenta anhidrobiosis, estado que

le permite sobrevivir bajo condiciones de desecación del suelo por más de ocho meses, característica que dificulta su control (Sánchez Delgado, 2007).

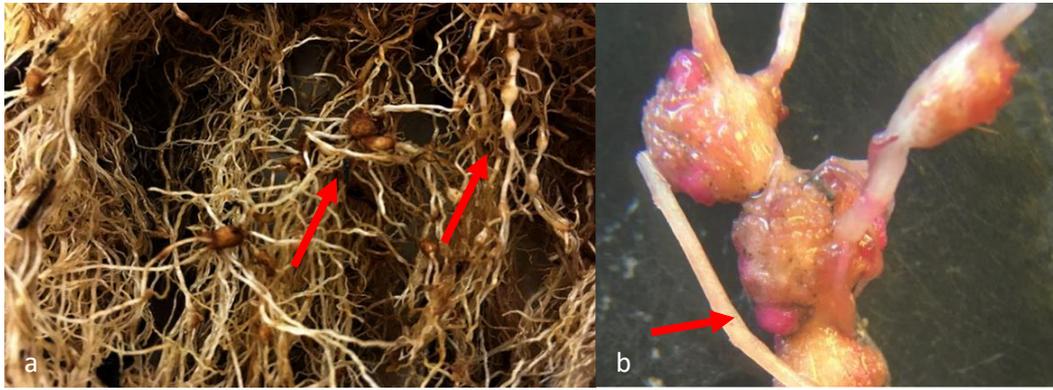
### **Ciclo de vida**

Este nematodo presenta dimorfismo sexual marcado, su ciclo de vida dura de 25 a 59 días, variando en función de las poblaciones específicas, tipo de hospedantes y condiciones ambientales. El ciclo comprende cuatro estadios juveniles y los adultos (Doucet & Lax, 2005). El primer estadio (J1) se desarrolla en el interior del huevo. La primera muda ocurre dentro del huevo y puede durar desde una hora hasta varios días (Manzanilla Lopez *et al.*, 2002). Luego de la muda, se forma un juvenil de segundo estadio (J2) que va a emerger al exterior. Este juvenil se desplazará en el suelo en busca de un hospedador adecuado. Una vez que penetra en una raíz, puede permanecer o salir para volver a entrar en la misma raíz en otro sitio, incluso más de dos juveniles pueden entrar por el mismo punto de penetración. Los juveniles se alimentan del citoplasma de células del parénquima cortical perforando las paredes con ayuda de su estilete. A medida que el nematodo se va alimentando, muda pasando por el tercer estadio (J3) (Doucet & Lax, 2005), el J3 inicialmente se parece al J2 pero tiende a adoptar una forma de "C" o enrollarse a medida que se alimenta y agranda. El género se puede distinguir poco después de la muda a la etapa J3: la hembra juvenil es más corta que el macho, con un primordio genital alargado situado más cerca de la región posterior que en el macho. Las J3 muestran la vulva en desarrollo como un parche transparente dentro de la oscuridad cerca de la región posterior. La muda a J4 puede ocurrir en la raíz o en el suelo (Manzanilla Lopez *et al.*, 2002). *Nacobbus aberrans* parece tener dos estrategias principales para desarrollarse hasta la etapa adulta: (1) después de la penetración de las raíces por el J2, el desarrollo puede ocurrir dentro y fuera de la raíz, con penetración y emigración repetidas hasta que se alcanzan las etapas adultas; (2) después de la penetración del J2, el desarrollo puede continuar dentro de la raíz hasta que el juvenil inmaduro alcanza la etapa femenina o masculina (Manzanilla Lopez *et al.*, 2002) (Imagen 1.3).



**Imagen 1.3:** Representación del ciclo biológico de *N. aberrans*. A) etapa embriogénesis, B) segunda estadio juvenil, ataca raíces, C) J2,J3,J4 y hembras jóvenes invaden la raíz como inoculo primario, D) J2 se alimentan de células puede salir y reinfectar la raíz formando falsos nudos, E) tercera estadio juvenil, F) cuarto estadio juvenil, G) nematodos adultos, el macho abandona la raíz, H) hembra deposita huevos en ovisaco, I) las agallas contienen hembras ovipositoras, J) K) índice de agallamiento (Sánchez Portillo, 2010).

La hembra inmadura penetra en el interior de la raíz y se aloja en la proximidad del cilindro central en donde induce el desarrollo de su sitio de alimentación (síncito). Con el transcurso del tiempo, va perdiendo su aspecto filiforme, se torna voluminosa, adquiere una forma ahusada (hembra madura) y se convierte en sedentaria, momento donde ocurriría la fecundación (Inserra *et al.*, 1983). Una vez fecundada, la hembra genera una matriz gelatinosa en la que se depositan entre 400-800 huevos (masa de huevos) que queda sobre la superficie de la agalla, en contacto con el suelo (Imagen 1.4). Los huevos eclosionarán de forma escalonada a medida que se den condiciones favorables (Doucet & Lax, 2005).



**Imagen 1.4:** a- Raíces de pimiento con agallas (Flechas rojas). b- Agallas con masas de huevos teñidas de rosa con fucsina acida (Flecha roja) (Imagen propia).

### Morfología de los distintos estadios.

En 1935, la morfología y la información biológica sobre *Nacobbus* fue proporcionada por Thorne con la descripción de la especie *Anguillulina aberrans* (Act *Nacobbus aberrans*) (Manzanilla López *et al.*, 2002): El género *Nacobbus* se caracteriza por: fuerte dimorfismo sexual con una hembra adulta hinchada e irregularmente distendida que tiene un solo ovario y vulva subterminal; machos vermiformes con una pequeña bursa que envuelve la punta de la región posterior; un estilete bien desarrollado en ambos sexos; cutícula anillada; campo lateral con cuatro incisiones irregularmente areoladas, fásmidos (glándulas sensoriales) en posición anterior en la región posterior; área labial redondeada, continua con tres a cuatro anillos; bulbo mediano redondeado con valva prominente; glándulas esofágicas que se superponen dorsalmente al intestino.

Huevos: Elipsoidales, de paredes delgadas. Los huevos de *N. aberrans* (75-92 × 35-46 μm) comienzan a segmentarse antes de la puesta. La primera etapa juvenil se desarrolla y muda a la segunda etapa en el interior del huevo (Imagen 1.5).



**Imagen 1.5:** Huevos de *Nacobbus aberrans* en 3 momentos del desarrollo del Juvenil del primer estadio (Garita, 2020).

Juvenil de segundo estadio (J2): Cuerpo alargado, delgado de 0,4 a 0,48 mm de longitud y 20 a 24 μm de ancho. Cabeza ligeramente desplazada con tres anillos y el estilete que mide 14 μm. Vista frontal similar a la de los adultos; cola roma, curvada ventralmente y

con una región hialina. El esófago ocupa 1/5 de la longitud del cuerpo y el intestino es granular (Imagen 1.6).

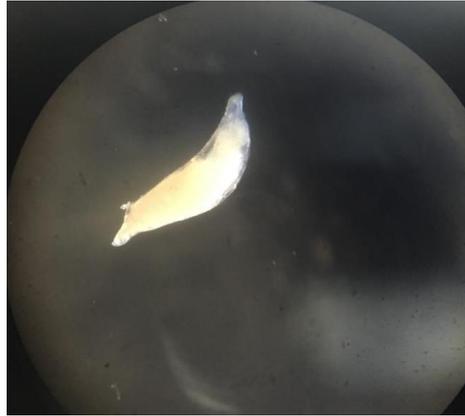


**Imagen 1.6:** Juvenil de segundo estadio (J2) de *Nacobbus aberrans* (Imagen propia).

Juveniles de tercer (J3) y cuarto (J4) estadio: Son endoparásitos migratorios pero menos móviles que los adultos J2. Se pueden diferenciar por un cuerpo en "forma de C", longitud total y ancho máximo del cuerpo. El J3 es más largo y ancho que el J2, con los lóbulos de las glándulas esofágicas subventrales más cortos que en el J2 y acostado a ambos lados del intestino en forma de "V" invertida con una superposición dorsal ligeramente más larga. Intestino muy granular y llena de glóbulos lipídicos. La J4 tiene una región hialina convexa (la futura vagina) cerca de la cola. En los machos, la gónada crece hacia la cloaca.

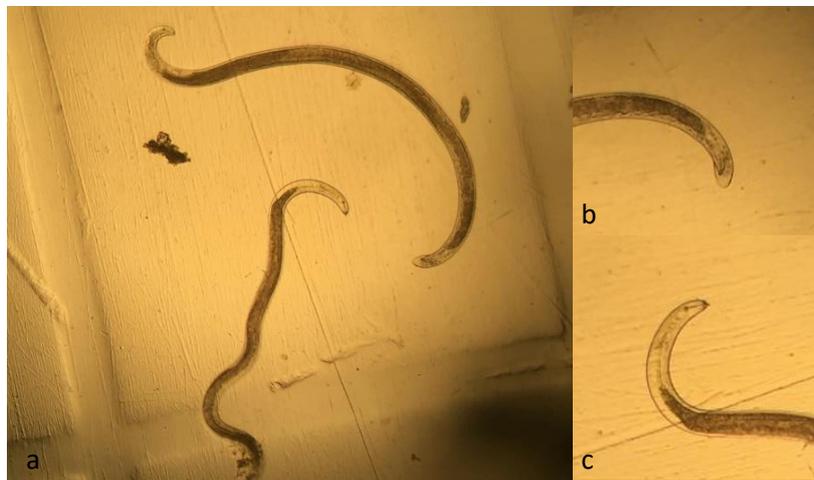
Hembra inmadura vermiforme: Cuerpo alargado-delgado de 0,7 a 0,9 mm de longitud y 30 a 35  $\mu\text{m}$  de ancho, con tracto reproductivo incompleto. Cutícula anillada con anastomosis. Campo lateral con cuatro incisiones (ocasionalmente cinco). Glándulas esofágicas alargadas, superpuestas dorsalmente al intestino. Unión esofago-intestinal anterior a las glándulas.

Hembra madura: En forma de saco en la parte central del cuerpo; región del cuello corta, región posterior redonda, márgenes lisos o irregulares de 0,8 a 1,2 mm de largo y de 132 a 345  $\mu\text{m}$  de ancho. Cara con disco bucal y apertura bucal similar a la de la hembra inmadura vermiforme con estilete de 20 a 24  $\mu\text{m}$ . La válvula esofago-intestinal no está desarrollada. Región anterior del tracto genital bien desarrollada con el útero alargado y contorneado, con o sin huevos. Vulva ubicada muy posteriormente (Imagen 1.7).



**Imagen 1.7:** Hembra madura de *Nacobbus aberrans* (Imagen propia).

Macho: Cuerpo vermiforme de 0,7 a 0,9 mm de longitud y 25 a 33  $\mu\text{m}$  de ancho. Estilete más largo que en la hembra (21 a 25  $\mu\text{m}$ ), región esofágica como en la hembra inmadura. Campo lateral con cuatro incisiones. Testículo único. Espícula ligeramente curvada ventralmente con terminación redonda a aguda. Bursa bien desarrollada (Una de las características que lo diferencia de *Meloidogyne spp.*) (Imagen 1.8).



**Imagen 1.8:** a- Machos de *Nacobbus aberrans*. b- Bursa bien desarrollada, característica típica de *N. aberrans*. c- Estilete (Imagen propia).

### **Daños y pérdidas provocados por *N. aberrans***

En hospedantes susceptibles se observa una reducción en su crecimiento, clorosis, enrollamiento de las hojas y marchitamiento general (Jatala, 1985) (Imagen 1.9). A nivel de producción, se pueden observar manchones cloróticos y marchitos de plantas

aisladas en el cultivo. Los frutos son de mala calidad y disminuyen los rendimientos considerablemente (Taylor & Sasser, 1983).



**Imagen 1.9:** Plantas de tomate afectadas por *N. aberrans* en una producción bajo cubierta en el CHLP (Imagen propia).

En las raíces de las plantas afectadas por este nematodo se observa la presencia de agallas que se extienden a lo largo de la raíz similares a las ocasionadas por *Meloidogyne sp.* pero dispuestas en forma individual a manera de rosario, de donde se deriva el nombre común de “nematodo del rosario de la raíz” (Mai *et al.*, 1981).

También se observan laceraciones y presencia de tejido necrótico debido a las repetidas penetraciones y emigraciones de los juveniles de la raíz al suelo (Doucet & Lax, 2005). Cuando las hembras se vuelven sedentarias dentro de la raíz, ellas provocan alteraciones exomorfológicas de la raíz y en la fisiología de sus células que corresponden a respuestas de hiperplasia e hipertrofia dando lugar a la formación de las agallas (Hewezi & Baum, 2013). Estas alteraciones derivan en la ruptura del xilema y floema alterando el normal flujo de sustancias a través de los tejidos de conducción y las plantas manifiestan marchitez, deficiencia en la absorción de N, P, K, Ca y Mg, baja conductancia estomática y en consecuencia baja asimilación de CO<sub>2</sub>, disminución del crecimiento, pérdidas del rendimiento e incluso la muerte de la planta (Cristobal *et al.*, 2001).

Las alteraciones causadas por las hembras sedentarias y los daños producidos en las raíces por entradas y salidas reiteradas de los juveniles (Manzanilla- Lopez *et al.*, 2002) como laceraciones y necrosis, afectan la integridad celular y la capacidad de retención de sustancias intracelulares, razón por la cual se incrementa la conductividad relativa

de los tejidos por la salida de electrolitos (Beltrano *et al.*, 2013). Estos daños se observan también ante factores ambientales adversos y situaciones de estrés.

El estrés por deficiencia de agua y nutrientes produce alteraciones en diferentes procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas, como en las relaciones hídricas (Silva *et al.* 2011), el intercambio gaseoso (Pagter *et al.*, 2005) y el metabolismo de los carbohidratos, proteínas, aminoácidos y otros compuestos orgánicos (Šircelj *et al.*, 2005). Como consecuencia de estos efectos suelen ocurrir otros estreses secundarios, como el estrés oxidativo. Este estrés provoca la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, conduciendo a la aparición de malondialdehído (MDA), uno de los subproductos de la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas, que suele ser utilizado como indicador de estrés (Ghaderian & Ravandi, 2012). Como consecuencia del estrés oxidativo se modifica la actividad de algunas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), guaiacol peroxidasa (POD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX), que son también utilizadas como indicadores de la respuesta de las plantas ante situaciones de estrés (Bharwana *et al.*, 2014).

Para la mayoría de los cultivos, faltan estimaciones de pérdidas por efecto de esta plaga (Manzanilla-López *et al.*, 2008). Se estima que en Argentina *N. aberrans* produce hasta un 40% de pérdidas en cultivos bajo cubierta (Adlercreutz *et al.*, 2007). En condiciones de campo, *N. aberrans* interacciona con otros patógenos del suelo. El daño provocado por la entrada y salida de juveniles es una puerta de entrada para otros patógenos como hongos (*Fusarium sp.*, *Phytophthora capsici*) y bacterias potenciando los daños y pérdidas en los cultivos (Hernández Anguiano *et al.*, 1992; López-Martínez *et al.*, 2011). Como ocurre con otras plantas parasitadas por nematodos, los costos indirectos, como el establecimiento de medidas de control, la degradación de la calidad del suelo, el costo de los procedimientos de cuarentena y la pérdida de tierras libres de nematodos para la producción de semillas, se suman a las pérdidas directas causadas por el impacto en el rendimiento (Jones *et al.*, 2013).

### **Medidas de control**

El control de los nematodos en el CHLP se ha basado tradicionalmente en nematicidas químicos muchas veces complementado con rotación de cultivos y cultivares resistentes pero principalmente en el uso de desinfectantes de suelo como el Bromuro de Metilo (Hang, 2009). A partir de la adhesión de Argentina al Protocolo de Montreal, se inició un proceso de reducción gradual de uso que establecía su prohibición total en el año 2015

(MBTOC, 1994). A medida que el uso de fumigantes se fue reduciendo fue aumentando la aparición de plagas difíciles de controlar como *N. aberrans*. Esto trajo aparejado un uso indiscriminado de nematicidas químicos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. Sumado esto a la alta diversidad genética dentro y entre las poblaciones de nematodos más el avance hacia una horticultura más sustentable es que hay una necesidad urgente de encontrar estrategias de gestión novedosas, respetuosas con el medio ambiente y eficaces para el control de poblaciones de nematodos. Dentro de las nuevas tecnologías está el uso de productos biológicos (bioinsumos), que implica incorporar al sistema productivo organismos seleccionados por sus funciones en diversos procesos biológicos (Puente *et al.*, 2010).

### **1.3- MICROORGANISMOS CON POTENCIAL NEMATICIDA.**

Todos aquellos productos biológicos que consistan o hayan sido producidos por microorganismos (bacterias, hongos y otros), artrópodos o extractos de plantas, y que estén destinados a ser aplicados como insumos en la producción agroalimentaria, agroindustrial y agroenergética sin generar impactos negativos en el agroecosistema se denominan bioinsumos (MAGyP, 2014). Los bioinsumos pueden ser clasificados de distintas formas, según su origen, pueden ser bioinsumos de origen vegetal o microbiano; según su efecto sobre la planta, pueden ser clasificados como biofertilizantes y biopesticidas. Tanto los biofertilizantes como los biopesticidas pueden subdividirse en otras categorías. En el primer caso pueden dividirse en bioestimulantes del crecimiento vegetal o bioestabilizadores; y dentro de biopesticidas pueden clasificarse los bioinductores de defensa frente a patógenos o biorepelentes (Gramuglia, 2014; Mamani de Marchese & Filippone, 2018).

La utilización de bioplaguicidas en Argentina surge como una alternativa eficaz y viable en el manejo de la salud vegetal. El uso del control biológico como estrategia para el manejo de plagas, o sea utilizar organismos vivos para reducir y mantener poblaciones de una plaga por debajo del umbral de daño económico, tanto a mediano como a largo plazo, es compatible con un bajo riesgo ambiental y una producción sustentable. Esto es posible ya que no dejan residuos químicos y actúan de manera más específica y permanente sobre la población problema (Gramuglia, 2014; Mamani de Marchese & Filippone, 2018).

La rizósfera es particularmente rica en diversidad y abundancia microbiana debida principalmente a la presencia de exudados y deposiciones radicales. Algas, hongos, protozoos y bacterias forman parte de la rizósfera. Diversas investigaciones han

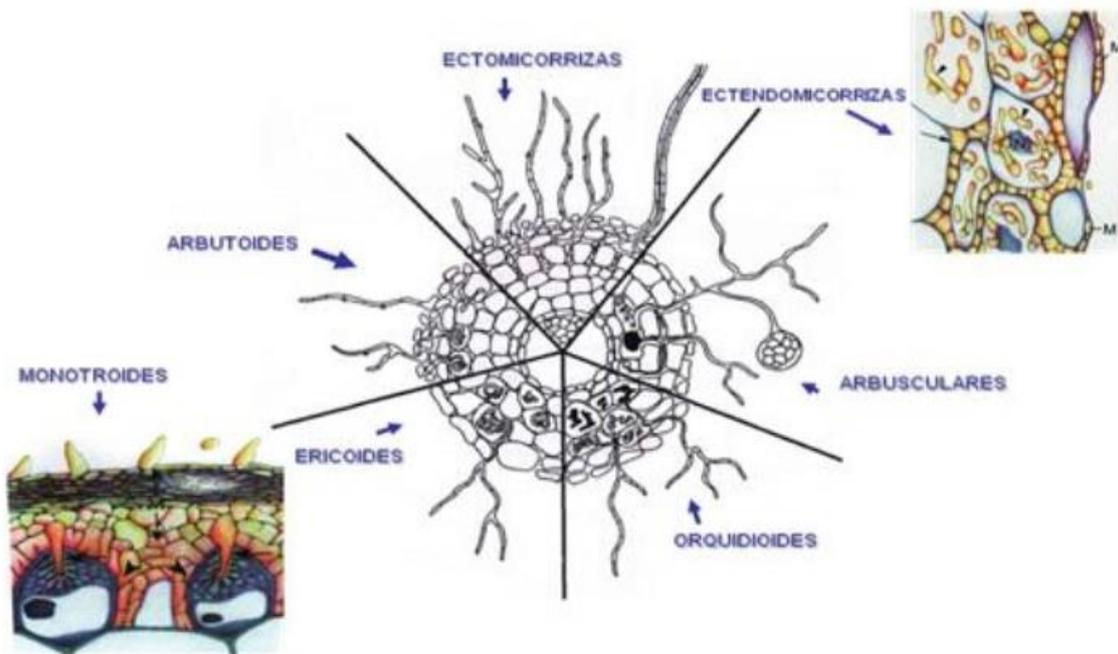
demostrado que algunos microorganismos que habitan la rizósfera presentan potencialidad para actuar como controladores de nematodos fitoparásitos, tanto por acción directa como indirecta, como es el caso de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), hongos nematófagos y rizobacterias (Schouteden *et al.*, 2015; Gortari & Hours, 2016).

### **1.3.1- Hongos micorrícicos arbusculares**

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares constituyen una parte esencial de los ecosistemas ya que forman simbiosis mutualistas con más del 95% de las plantas vasculares terrestres. Esta simbiosis estimula el crecimiento de la planta hospedadora, a través de la modificación física y/o química de la rizósfera, lo cual se traduce en una mayor disponibilidad de nutrientes, especialmente fósforo y zinc, y mayor tolerancia al estrés (Cantrell & Linderman, 2001; Ramírez Gómez & Rodríguez Villate, 2010). El hongo por su parte depende completamente de la planta para obtener los carbohidratos que requiere para su desarrollo (Quilambo, 2003; Sarabia Ochoa *et al.*, 2010).

#### **Clasificación**

La clasificación de las micorrizas se basa en ciertas características morfológicas del hongo, el nivel de penetración en la raíz o el tejido, así como los taxones involucrados. Hay dos grandes tipos de micorrizas de acuerdo con la forma de penetración de las hifas en las células de la raíz: ectomicorrizas y endomicorrizas (Imagen 1.10) (Frioni, 2006; Valdes *et al.*, 2020).



**Imagen 1.10:** Clasificación de las micorrizas (Madrid *et al.*, 2016).

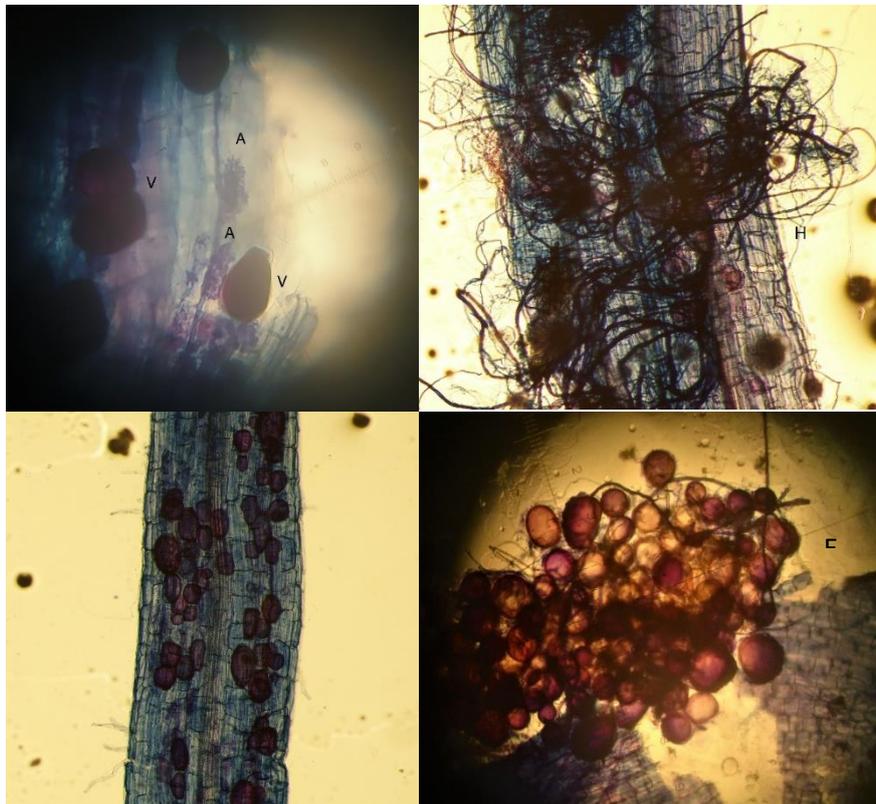
### ***Ectomicorrizas***

Las ectomicorrizas son formadas por hongos pertenecientes al grupo de los Basidiomycetes y ocurren en menor porcentaje que las endomicorrizas, dado que tienen un menor rango de hospedantes vegetales y se limitan principalmente a regiones templadas y frías. Dentro de los hospedantes se encuentran distintos grupos de plantas de porte arbóreo o arbustivo, tales como las familias *Pinaceae*, *Araucariaceae*, *Cupressaceae*, *Gnetaceae*, *Polygonaceae*, *Nyctaginaceae*, *Myrtaceae*, *Salicaceae*, *Fabaceae*, y los órdenes *Fagales* y *Malvales* y entre algunas especies de hongos podemos nombrar a *Lactarius deliciosus* (níscolo, robellón), *Amanita caesarea* (oronja o huevo de Rey), *Pleurotus ostreatus* (girgola), (Wang & Qiu, 2006; Valdes *et al.*, 2020).

En las ectomicorrizas, el hongo forma una estructura llamada manto que encierra las raicillas lo cual produce una modificación de la raíz. Desde allí, las hifas irradian hacia el exterior en el sustrato. Las hifas también penetran hacia adentro entre las células de la raíz para formar un sistema intercelular complejo, colonizan el apoplasto radical, que aparece como una red de hifas, llamada red de Hartig. Hay poca o ninguna penetración intracelular (Smith & Read, 2008; Valdes *et al.*, 2020). La red de hifas conforma un manto fúngico que rodea las raíces, las células corticales se alargan transversalmente y los pelos suelen estar ausentes o totalmente cubiertos. Este manto hifal puede llegar a representar el 40% del órgano (Frioni, 2006; Valdes *et al.*, 2020).

## **Endomicorrizas**

En este tipo de micorrizas las hifas de los hongos crecen tanto inter como intracelularmente en la raíz, es decir, por vía apoplástica y simplástica. Carecen de un manto hifal alrededor de las raíces, aunque algunos subtipos de endomicorrizas suelen tenerlo. Dentro de la raíz, el hongo coloniza las células de la corteza, pero no alcanza la endodermis (Valdes *et al.*, 2020). Las endomicorrizas se clasifican en tres tipos: Arbuscular, son el tipo de micorrizas más común, las orquidoides y las ericoides (Imagen 1.10). En este trabajo se va a hacer hincapié en las micorrizas arbusculares. Como se mencionó anteriormente las micorrizas arbusculares son el tipo de micorrizas más común debido a que se encuentra en simbiosis con más del 95% de las plantas vasculares como leguminosas herbáceas y leñosas, cereales, frutales y la mayoría de los cultivos hortícolas. El nombre "arbuscular" se deriva de estructuras características, los arbuscúlos (Imagen 1.11) que se encuentran dentro de las células corticales de las raíces y son la estructura de intercambio bidireccional de señales, nutrientes, agua y compuestos orgánicos entre los dos simbiosites (Smith & Read, 2008). Sin embargo, se reconoce una gama bastante amplia de estructuras intrarradicales formadas por hongos MA (Dickson, 2004), incluidas las hifas intracelulares bien desarrolladas, que a veces se presentan en ausencia de arbuscúlos, las vesículas que actúan como reservorio de nutrientes, principalmente lípidos (Imagen 1.11) y un micelio extrarradical en el suelo (Bowen, 1987).

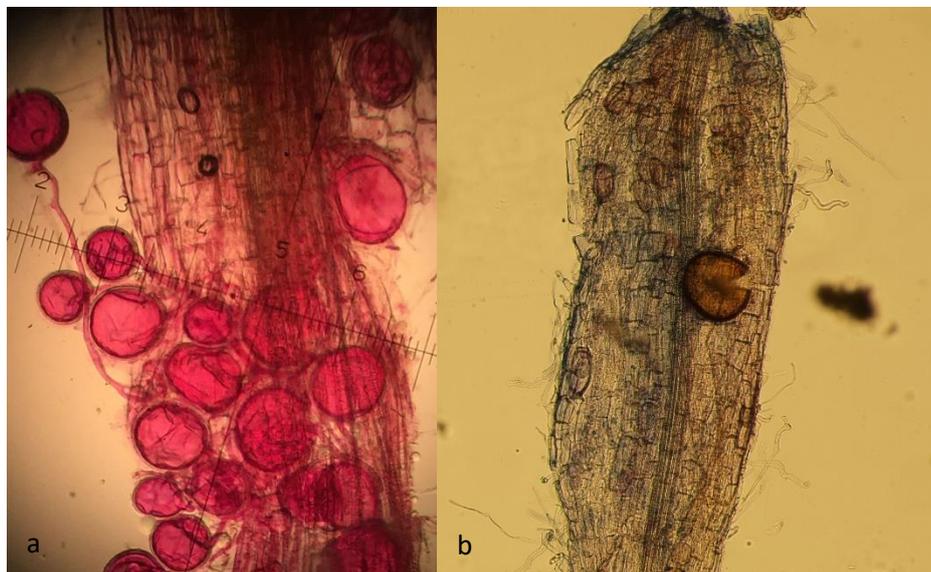


**Imagen 1.11:** Raíces de *Rizophagus intraradices* teñidas con azul de tripan. A: arbúsculos; H: Hifas; V: vesículas; E: esporas (Imagen propia).

### Establecimiento de la simbiosis

La colonización de raíces por hongos MA puede surgir de tres fuentes principales de inóculo en el suelo: esporas, fragmentos de raíces infectadas e hifas, denominados colectivamente propágulos. Las esporas grandes con paredes gruesas resistentes y numerosos núcleos son estructuras de supervivencia a largo plazo con cierta capacidad de dispersión por el viento y el agua.

Durante muchos años se asumió que las esporas eran los propágulos más importantes, posiblemente los únicos (Imagen 1.12). El conjunto de esporas en un sitio puede estar compuesto típicamente por alrededor de 20 a 50 especies abarcando diferentes edades y diferentes estados de latencia o inactividad (Smith & Read, 2008). Es una estructura típica de la colonización micorrícica que tiene valor taxonómico ya que tienen ciertos caracteres morfológicos como su ontogenia y germinación, la conexión hifal, el número y tipo de componentes, la presencia de ornamentaciones, el tamaño y el color, y la reacción al reactivo de Melzer que permite poder identificar los distintos géneros. Actualmente se complementa con técnicas moleculares (Valdes *et al.*, 2020).



**Imagen 1.12-** Esporas de *Rhizophagus intraradices* en raíces de pimiento teñidas con fucsina acida (a) y azul de Tripan (b) (Imagen propia).

### Pre-infección:

La colonización de raíces por hongos MA puede iniciarse a partir de hifas que crecen a partir de cualquiera de las tres fuentes de inóculo descritas anteriormente. Una serie de cambios en las células de la raíz permiten que se forme el aparato de prepenetración (APP) (Genre *et al.*, 2005). En esta etapa existe un intercambio de señales, las raíces de las plantas promueven la morfogénesis diferencial que consiste en la ramificación profusa de hifas y su proliferación. Los exudados de las raíces contienen diferentes tipos de compuestos, incluidos unos con acción hormonal que favorecen la germinación de esporas, el crecimiento y ramificación de la hifa germinativa y la localización de las raíces del hospedero como isoflavonoides, quercitina, y flavonas como hepertina, naringenina y apigenina (Nicolson, 1959; Sharma & Johri, 2002; Smith & Read, 2008; Ruscitti, 2020).

### **Infección primaria:**

El contacto de la hifa con la raíz suele ir seguido de la adhesión de la hifa a la superficie de la raíz y, después de unos 2-3 días, la formación de apresorios seguido por la penetración de las raíces y la formación de arbusculos alrededor de 2 días después. Aunque no todos los hongos MA forman apresorios bien definidos en todas las condiciones, los cambios morfogénéticos en la superficie de la raíz indican que el hongo ha reconocido la presencia de una planta hospedante potencial. Se ha demostrado que los flavonoides son importantes en la fase inicial, pero las estrigolactonas han mostrado ser señales de fundamental importancia en el desarrollo de la simbiosis (Akiyama *et al.*, 2005), ya que el estímulo de esta hormona en el hongo es necesario para la producción de los factores “Myc” y la activación de la expresión de genes ENDO11 para el establecimiento de la simbiosis (Ramírez Gómez & Rodríguez, 2012; Ruscitti, 2020).

### **Extensión del hongo en las raíces y en la rizósfera:**

La extensión del hongo en la raíz se divide en tres fases. (i) La fase inicial durante la cual se produce la infección primaria. (ii) La fase exponencial durante la cual el hongo se propaga inter e intracelularmente, especialmente en las raíces secundarias finas, de manera que el hongo crece más rápido que la raíz. Las hifas que crecen por fuera de la raíz, penetran la raíz nuevamente a distancias irregulares. La propagación de la infección es interna o en la superficie de la raíz. (iii) La fase meseta durante la cual el crecimiento de la raíz y el hongo son similares (Valdes *et al.*, 2020).

### **Propagación del hongo a través del suelo:**

Después de la infección primaria y durante la primera fase de la propagación en la raíz, crecen hifas desde la raíz hacia la rizósfera en el suelo. Estas hifas son las que llevan a cabo la absorción de agua y nutrientes del suelo a la planta (Read & Smith, 2008; Valdes *et al.*, 2020). Las hifas principales pueden medir entre 5 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro que pueden ramificarse dicotómicamente, e hifas secundarias más finas de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Valdes *et al.*, 2020).

### **Mecanismos de acción**

Además de mejorar el estado nutricional y el crecimiento de su hospedante vegetal, los hongos MA ofrecen otros beneficios, entre los que se destacan: limitan la absorción de metales pesados como el zinc y el cadmio, contribuyen a mejorar las propiedades físico-químicas del suelo, estimulan la formación de agregados mejorando la estructura y estabilidad del suelo, reduciendo su erosión y aumentando su capacidad de retención de agua (Finlay, 2008), disminuyen significativamente el efecto detrimental de la salinidad (Ruscitti *et al.*, 2007) y también pueden conferir tolerancia a patógenos del suelo, ya sea por competencia por los sitios de colonización (Linderman, 1992) o por activar mecanismos de defensa en la planta huésped (Barea *et al.*, 2005; Kaya *et al.*, 2009; Ruscitti *et al.*, 2011).

Nuestro interés se basa en como las micorrizas pueden conferir tolerancia a patógenos a través de diferentes mecanismos de acción, los cuales son:

#### **- Mayor absorción de nutrientes**

Se sabe que los hongos micorrízicos arbusculares pueden aumentar la absorción de agua y nutrientes minerales para su planta huésped, como el fósforo y el nitrógeno (Baum *et al.*, 2015). A cambio, reciben carbono de la planta huésped (Gianinazzi *et al.*, 2010). Las plantas con un mejor estado nutricional son capaces de tolerar mayores densidades de población de nematodos en sus raíces. También podría compensar el daño causado por patógenos (Schouteden *et al.*, 2015).

#### **- Competencia por nutrientes o espacio**

La competencia por los nutrientes o por el espacio y los sitios de infección ocurren entre microorganismos con los mismos requisitos fisiológicos, especialmente donde los recursos como el carbono podrían ser limitados (Vos *et al.*, 2014). Las micorrizas compiten con los patógenos por estos recursos lo cual indica que una colonización

temprana en la raíz evitaría el ingreso de patógenos (Vos *et al.*, 2014; Schouteden *et al.*, 2015).

### **- Efecto de los exudados radiculares**

La simbiosis con hongos MA conduce a una alteración en la composición y nivel de exudación de la raíz (Shouteden *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2004), dependiendo de esta composición puede impactar en los microorganismos de la rizósfera ya sea estimulando su crecimiento o suprimiéndolo. La mayor parte de los compuestos químicos que forman parte de los exudados radiculares son metabolitos secundarios, con preponderancia de compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos) como así también ácidos orgánicos, azúcares simples y aminoácidos (Steinkellner *et al.*, 2007; Lioussanne *et al.*, 2008) e incluso la hormona vegetal estrigolactona (López-Ráez *et al.*, 2011). Se han informado diferencias cualitativas y cuantitativas de la composición de los exudados entre plantas micorrizadas y no micorrizadas (Shouteden *et al.*, 2015). La exudación de la raíz depende además de la planta o especie de HMA involucrada así como del grado de simbiosis, del ambiente y la situación de estrés (Shouteden *et al.*, 2015). Se han reportado diferentes estudios que informaron que los exudados radicales alteran la comunicación entre hospedantes y hospederos, lo que disminuye la tasa de infección (Vos *et al.*, 2012; Schouteden *et al.*, 2015), además inhiben la esporulación de hongos patógenos como *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia* (Hao *et al.*, 2011; Lioussanne *et al.*, 2008) y afectan negativamente la motilidad de *Meloidogyne* sp y su penetración en las raíces (Vos *et al.*, 2012).

### **- Inducción de resistencia**

Los hongos micorrícicos en las raíces pueden provocar una respuesta de defensa donde se desencadena una serie de cambios bioquímicos que pueden darse a nivel local o de forma sistémica (Schouteden *et al.*, 2015). La micorrización provoca una reacción en la planta, como un incremento en la síntesis de enzimas hidrolíticas, como quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa (El-Khallal, 2007), así como enzimas asociadas con la síntesis de compuestos fenólicos, fitoalexinas y barreras estructurales como la lignificación de las paredes celulares (Guillon *et al.*, 2002). Estudios recientes determinaron que dichas respuestas ocurren más rápidamente en plantas micorrizadas comparadas con las no micorrizadas ante el ataque de patógenos, lo que actuaría a modo de Resistencia Sistémica Inducida, preparando a la planta para enfrentar nuevos ataques (Pozo *et al.*, 2010). Los niveles de varias fitohormonas, principalmente ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JAs), etileno (ET) y ácido abscísico (ABA) suelen verse alterados en plantas

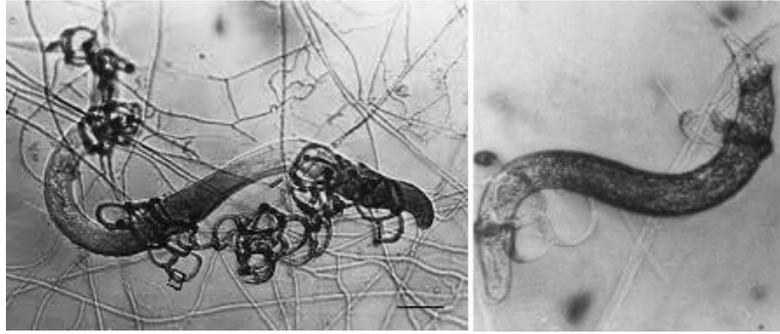
micorrizadas (Hause *et al.*, 2007; López-Ráez *et al.*, 2010), afectando los mecanismos de defensa de las plantas, por ej. el ácido salicílico suele ser inhibido por las micorrizas mientras que se produce una inducción de las vías de señalización del ácido jasmónico, esto logra una activación eficiente de las defensas. La rápida inducción o mayor activación de las respuestas de defensa tras la colonización por un agente biológico externo se denomina “priming” o “potenciación”, y está asociada a la resistencia sistémica inducida por las micorrizas y que está regulada por la vía de señalización del ácido jasmónico (Van Wees *et al.*, 2008; Pozo *et al.*, 2010).

El estrés biótico también provoca un desequilibrio en la producción de radicales libres que tienen la capacidad de producir daños oxidativos, las Especies Reactivas del Oxígeno (ROS). Las ROS, como el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo (OH), ocurren normalmente en el metabolismo celular; sin embargo, bajo condiciones de estrés, su producción puede aumentar provocando la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las plantas micorrizadas incrementan la actividad de enzimas antioxidantes como la peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, para contrarrestar el daño oxidativo (Lambais *et al.*, 2003).

### **1.3.2- Hongos nematógafos**

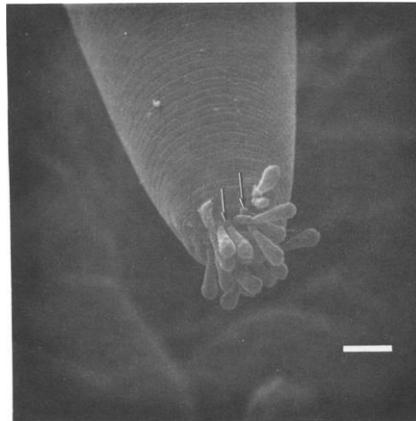
Otros microorganismos que tienen potencial nematocida son los oportunamente considerados como hongos nematófagos. Ellos tienen la capacidad de atacar, matar y digerir nematodos, pueden vivir saprofiticamente en materia orgánica muerta, atacar a otros hongos (microparásitos) y colonizar raíces de plantas como endófitos (Nordbring-Hertz *et al.*, 1995). Aunque pertenecen a diferentes grupos ecológicos (Sagués *et al.*, 2011), según el mecanismo de acción se pueden diferenciar cuatro principales categorías:

- Hongos atrapadores de nematodos: Estos hongos suelen utilizar diferentes estructuras especializadas para atrapar juveniles como anillos constrictores o no constrictores pero con extremos pegajosos entre otros. Ejemplos de estos hongos son *Arthrobotrys* y *Monacrosporium* (Rodríguez- Kabana, 1991).



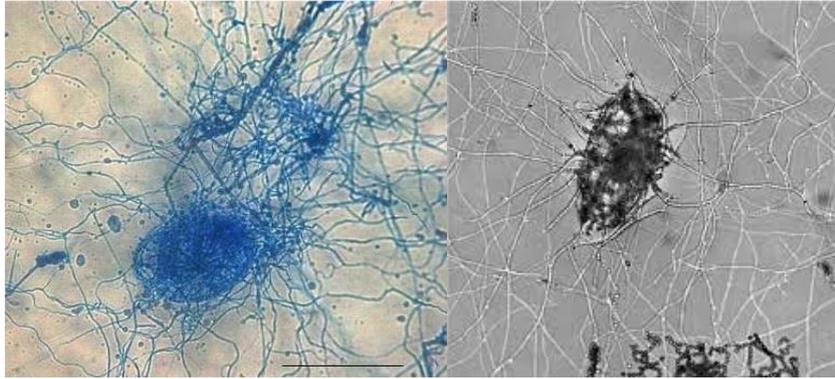
**Imagen 1.13:** *Arthrobotrys oligospora* atrapando a un nematodo de vida libre (a) (Nordbring-Hertz, 2004) y a *Meloidogyne graminicola* (b) (Singh *et al.*, 2012).

- Hongos endoparásitos: Utilizan sus esporas para infectar el interior de los nematodos. Las esporas pueden ser móviles o inmóviles que se adhieren a la cutícula de los juveniles. Ej. *Drechmeria spp.* y *Harposporium spp.* (Piedra Naranjo, 2008).



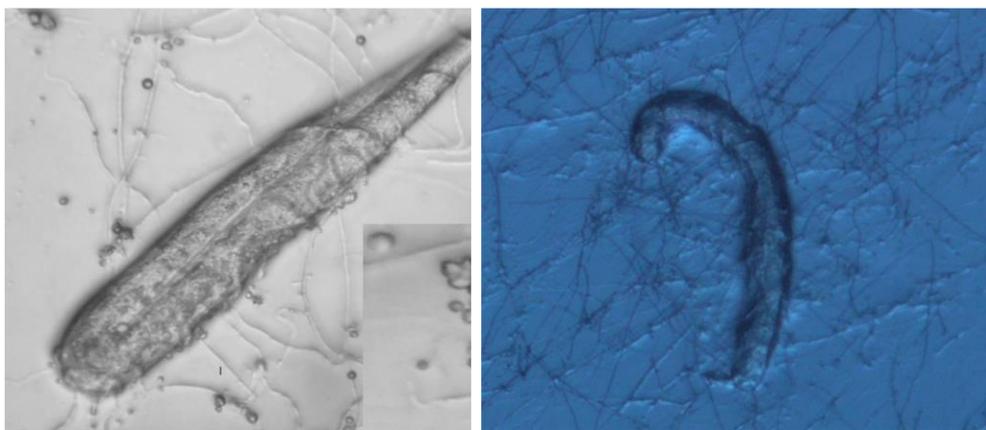
**Imagen 1.14:** *Panagrellus redivivus* infectado con conidios del hongo nematófago endoparásito *Meria coniospora* (Jansson, 1982).

- Hongos parásitos: El mecanismo de acción de estos hongos es el parasitismo de huevos, juveniles y hembras sedentarias. Como es el caso de *Purpureocillium lilacinum* y de *Pochonia chlamydosporia* (Flores-Camacho *et al.*, 2008; Hernández & Hidalgo Díaz, 2008, Cavello *et al.*, 2015).



**Imagen 1.15:** Huevos de *N. aberrans* (a) y *Meloidogyne spp.* (b) parasitado por *Purpureocillium lilacinum* (Gortari & Hours, 2019; Varela Benavides *et al.*, 2016).

- Hongos productores de toxinas como ha sido reportado para el hongo ligninolítico *Pleurotus ostreatus* (Piedra Naranjo, 2008).



**Imagen 1.16:** *Panagrellus sp.* (a) y *Poikilolaimus oxycercus* (b) inmovilizados por la tóxina de *Pleurotus ostreatus* (Genier *et al.*, 2015; Marlin *et al.*, 2019).

Luego de una selección hecha en trabajos anteriores, para esta tesis se utilizaron dos hongos nematófagos, *Purpureocillium lilacinum*, perteneciente al grupo de los hongos parásitos y *Pleurotus ostreatus* perteneciente al grupo de los hongos productores de toxinas.

### - *Purpureocillium lilacinum*

#### **Clasificación y morfología**

Clasificación taxonómica según Mycobank website; <http://www.mycobank.org/>:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Orden: Hypocreales

Familia: Ophiocordycipitaceae

Género: *Purpureocillium*

Especie: *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson.

Las colonias de *Purpureocillium* alcanzan 5 a 7 cm en 14 días a una temperatura de 25°C presentando textura algodonosa, densa, con borde lobulado y un color lila (Imagen 1.17). El rango óptimo de temperatura para su crecimiento va de los 26 a 30°C y un pH de 2 a 10 (Acosta, 2006).

Este hongo es normalmente saprótrofo y produce un espeso micelio de donde se diferencian los conidióforos. La producción de conidióforos, y por ende la concentración final de conidios, puede verse afectado o estimulado dependiendo de la humedad y la disponibilidad de nutrientes. Sus hifas normalmente poseen una textura lisa y presentan un espesor entre 3 y 5 µm. A partir de estas estructuras se forman los conidióforos que pueden llegar a tener hasta 650 µm, los cuales producen conidios con carácter fusiforme (Acosta, 2006; Inglis *et al.*, 2000).



**Imagen 1.17:** Colonia de *P. lilacinum* LPSC# 876 (Imagen propia).

### **Mecanismo de acción**

Se ha demostrado que *P. lilacinum* penetra directamente todos los estados del nematodo luego de la formación del apresorio. Esta estructura se adhiere a la superficie del huevo o del nematodo y libera enzimas (quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanase) y quimiotripsina (una serina proteasa) que le confieren la capacidad de penetrar a sus hospederos (Gupta *et al.*, 1993). Una vez invadidos se hinchan como resultado de la alteración de la permeabilidad de la pared y sufren una serie de cambios estructurales (Mukhtar *et al.*, 2013). Brand *et al.* (2004), señalan que la capa vitelina del huevo del

nematodo se divide en tres membranas separadas, la capa de quitina se torna vacuolada luego de la penetración y la capa lipídica desaparece, provocando la destrucción del embrión. En la mayoría de los casos el hongo no sólo ataca las masas de huevos, sino también penetra en el cuerpo de las hembras adultas ovíparas y las destruye (Kiewnick & Sikora, 2005). Este hongo fue estudiado tanto para controlar los nematodos, como para mejorar las condiciones de la planta, ofreciendo una promoción en el crecimiento vegetal notable (Hashem & Kamal, 2011). Tiene efecto bioestimulante debido a que produce ácido indol acético (AIA), sideróforos, tiene actividad proteolítica y produce solubilización de fosfatos (Correa Gutierrez, 2011).

### - *Pleurotus ostreatus*

#### **Clasificación y morfología**

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Subclase: Agaricomycetidae

Orden: Agaricales

Familia: Pleurotaceae

Género: *Pleurotus*

Los hongos del género *Pleurotus* (Basidiomycota) constituyen un verdadero sistema de producción-consumo, el cual ha adquirido gran relevancia social, económica y ecológica en el mundo (Chang & Miles, 2014). Son potentes agentes biológicos que pueden crecer a expensas de los residuos agrícolas (sustratos) y diferenciar esporomas (fructificaciones) aptos para el consumo humano. En general, *Pleurotus* spp. presenta un sombrero o píleo liso convexo, raramente redondo, casi siempre en forma de ostra. Puede presentar escamas hacia el centro o en la base y los cuerpos fructíferos son por lo general concrecentes. El píleo puede medir entre 5 y 12 cm de diámetro. Su color es muy variable, negro violáceo, pardo ceniciento, gris, amarillo, blanco, rosa según la especie. Sus laminillas son muy decurrentes, anastomosadas en la base, anchas, blancas y algunas veces amarillas. El estípite es corto, excéntrico o lateral, engrosado gradualmente hacia el lado del sombrero o píleo, algunas veces no se presenta. Generalmente mide alrededor de 2 cm de largo, 1-2 cm de grosor, y es blanquecino (Imagen 1.18) (Guzmán, 1990).



**Imagen 1.18:** a- Colonia de *P. ostreatus* en medio agar papa glucosado; b y c- Fructificación de *P. ostreatus* en sustrato de semillas de avena (Imagen propia).

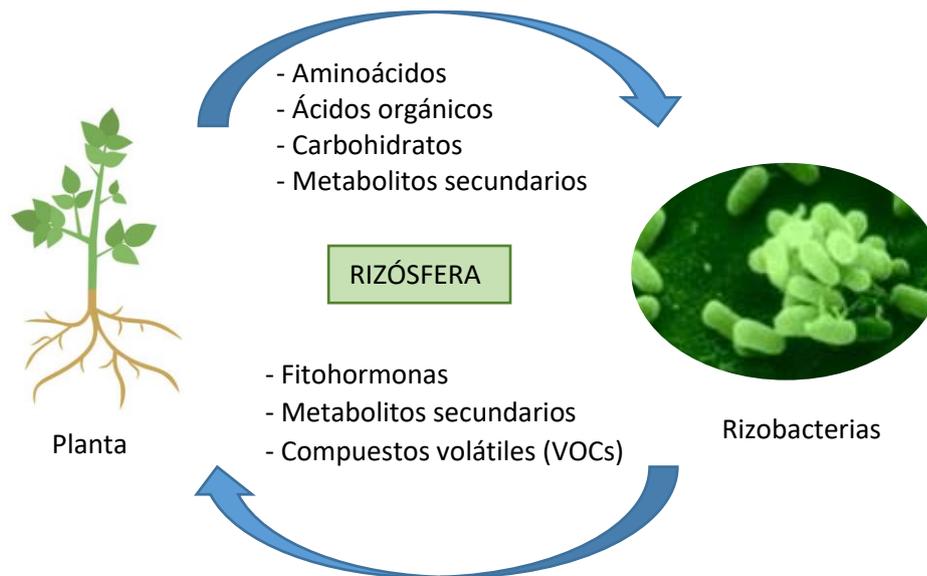
### Mecanismo de acción

Las especies de *Pleurotus spp.* presentan un gran interés para la agricultura y la economía, ya que se pueden desarrollar sobre una gran cantidad de sustratos lignocelulósicos útiles no sólo para la alimentación humana, sino también para otros aspectos como la alimentación animal, la medicina, la farmacia, la industria química, el control biológico, la descontaminación de suelos, etcétera. El material residual del sustrato sobre el que fructifica es un subproducto que puede tener diversas aplicaciones como abono orgánico para el sector hortícola y florícola, sustrato nematocida (debido a la capacidad de las hifas de producir toxinas), bactericida y para la biorremediación *in-situ* de agua y suelo contaminados con xenobióticos (Chang & Miles, 2014). La mayoría de las especies del género *Pleurotus* infectan nematodos colonizándolos. Las especies que más se han investigado son *P. ostreatus*, *P. florida*, *P. sajor-caju*, *P. eryngii*, y *P. cornucopiae* (Hibbett & Thorn, 1994). Entre los mecanismos implicados en la actividad nematocida, el hongo descomponedor de madera *Pleurotus ostreatus* y otras especies del género *Pleurotus* producen enzimas quitinasas y proteasas que actúan como toxinas nematocidas. La capacidad nematocida de estas toxinas y la expresión de los síntomas varía dependiendo de la especie de hongo y del tiempo de exposición. *P. ostreatus* produce hifas vegetativas que generan una potente toxina: ácido trans-2 decenodioico (Kwok *et al.*, 1992). Los nemátodos en contacto con los exudados del hongo conteniendo las toxinas muestran una inmediata respuesta y se vuelven más o menos inmóviles. Estimuladas por productos excretados por el huésped inmóvil, algunas hifas direccionales convergen en los orificios del cuerpo del nemátodo, lo colonizan y lo

digieren (Barron & Thorn, 1987), utilizando su contenido como fuente de nitrógeno (Sierra Monroy, 2014).

### **1.3.3- Rizobacterias**

Las bacterias son los microorganismos más abundantes de la rizósfera albergando más de 30.000 especies diferentes de rizobacterias (Mendes *et al.*, 2011). Kloepper & Schroth (1978) han definido a las bacterias que habitan la rizósfera de las plantas y que tiene efecto positivo sobre ellas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, siendo sus siglas en inglés PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Dentro de esta clasificación se encuentran distintos géneros bacterianos: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter* y *Azotobacter*, entre otros (Kloepper *et al.*, 1989; Kennedy *et al.*, 2004; Podile & Kishore, 2006). Las PGPR colonizan la rizosfera, el rizoplaneo (superficie de la raíz), o la raíz misma (dentro de los tejidos radiculares) (Gray & Smith, 2005; Beneduzi *et al.*, 2012). Esto se produce cuando por medio del flujo de metabolitos, como nutrientes y señales presentes en los exudados radiculares, se activan procesos de quimiotaxis que permiten a las rizobacterias ser atraídas hacia las raíces y establecerse sobre los tejidos vegetales logrando una relación de mutualismo con las plantas. Los exudados provenientes de las plantas para el proceso de colonización de las rizobacterias suelen ser aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos y metabolitos secundarios. De esta relación las plantas obtienen de las rizobacterias fitohormonas (Auxinas, Citoquininas, Giberelinas, Ac. Abscísico), metabolitos secundarios (Sideróforos, AHLs, ciclodipeptidos), compuestos volátiles como alcoholes y cetonas (VOCs), sacáridos y enzimas. Dentro del proceso de colonización de las raíces, luego de producido el intercambio de señales entre las plantas y rizobacterias, se produce la formación de un biofilm bacteriano sobre las raíces. El biofilm es un conjunto (mono o poli especie) de microorganismos adheridos a una superficie abiótica o biótica, e inmersos en una matriz polimérica auto secretada (EPS, proteínas). Esta estrategia les confiere a los microorganismos ventajas adaptativas que les posibilitan, además, una mayor sobrevivencia ante condiciones ambientales adversas, antibiosis y/o predación (Rinaudi & Giordano, 2010).



**Figura 1.2:** Interacción planta-rizobacterias en la rizosfera.

Las PGPR generalmente se clasifican en las siguientes categorías según el efecto sobre el crecimiento y desarrollo de la planta:

- a) Bioprotectores: Comprende cepas de PGPR que actúan como agentes de control biológico para suprimir los patógenos y así evitar que las plantas contraigan enfermedades o infecciones (Odelade & Babalola, 2019; Subedi *et al.*, 2020)
- b) Biofertilizantes: Son las cepas de PGPR que mejoran la absorción de nutrientes por las plantas y así promueven la germinación y el crecimiento de las plántulas lo que conlleva a una mejora del rendimiento (Enebe & Babalola, 2018). Algunos mecanismos involucran la fijación de  $N_2$ , aumentan la disponibilidad de fósforo para las plantas (Richardson *et al.*, 2009) y la liberación de ácidos orgánicos (Odelade & Babalola, 2019).
- c) Bioestimulantes: comprende las cepas de PGPR capaces de producir fitohormonas como citoquininas, auxinas, entre ellas ácido indol acético (IAA), vitaminas y riboflavina descritos como bioestimulantes (Hayat *et al.*, 2010; Odelade & Babalola, 2019).

A través de diversos mecanismos, las PGPR pueden estimular el crecimiento de la planta hospedante y aportar a mantener un rizomicrobioma equilibrado, minimizando así el ataque de fitopatógenos. Los mecanismos de acción pueden ser directos e indirectos. Dentro de las acciones directas se pueden encontrar:

- Producen reguladores del crecimiento vegetal (son los denominados bioestimulantes)

- Mejoran la biodisponibilidad de nutrientes (son los denominados biofertilizantes).

Los géneros que representan estos grupos son: *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* y *Rhizobium*.

Dentro de mecanismos de acción indirectos se encuentran los que:

- Antagonizan fitopatógenos
- Estimulan las defensas de las plantas

Los géneros más comunes son *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* siendo los mecanismos más comunes:

#### **- Enzimas hidrolíticas**

Los nematodos presentan diferentes tipos de proteínas estructurales y sus proporciones cambian a lo largo de su ciclo de vida, la etapa del huevo presenta un complejo quitina/proteína (colágeno y proteínas similares al colágeno) mientras que la etapa móvil tiene principalmente una cutícula más externa compuesta de glicoproteínas, lípidos y proteínas (Page *et al.*, 2014). Hay varios tipos de enzimas que liberan las PGPR que tienen la capacidad de degradar rápidamente los principales componentes de la cutícula del nematodo y de la cutícula del huevo (Yang *et al.*, 2013). Las proteasas son enzimas con la capacidad de hidrolizar péptidos. La mayoría de las bacterias con características nematicidas liberan proteasas de serina y cisteína (Castañeda Álvarez *et al.*, 2016). Las quitinasas son enzimas que hidrolizan la N-acetil-D-glucosamina, cadenas de polisacáridos presentes en la quitina que forman parte principalmente de la cutícula del huevo (Gortari & Hours, 2016). Las lipasas son enzimas que hidrolizan los ésteres de glicerol, preferiblemente de ácidos grasos de cadena larga. Tanto los huevos como las formas móviles contienen lípidos en sus estructuras internas y en la cutícula (Page *et al.*, 2014; Castaneda-Alvarez & Aballay, 2016).

#### **- Resistencia sistémica inducida**

La resistencia sistémica inducida se define como la habilidad o la capacidad defensiva de la planta contra un amplio espectro de patógenos y plagas que se adquiere después de la estimulación adecuada. La resultante resistencia elevada debido a un agente inductor sobre la infección por patógenos se llama Resistencia Sistémica Inducida (ISR siglas en inglés). La inducción de resistencia sistémica por rizobacterias se conoce como ISR, es de naturaleza inespecífica y proporciona a las plantas "una protección duradera"

y una resistencia a enfermedades de amplio espectro (Reddy, 2012; Subedi *et al.*, 2020). Una gran cantidad de enzimas de defensa se asocian con ISR entre las más importantes se encuentran la fenilalanina amoniaco liasa (PAL), quitinasa, b -1, 3-glucanasa, peroxidasa (PO), polifenol oxidasa (PPO), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), lipo xygenasa (LOX), ascorbato peroxidasa (APX) e inhibidores de proteinasas. Estas enzimas también pueden estimular la liberación de moléculas que provocan la inducción de resistencia como fitoalexinas y compuestos fenólicos (Reddy, 2012; Subedi *et al.*, 2020). Otros compuestos relacionados con la ISR mediados por las PGPR son los lipopolisacáridos, los sideróforos y el ácido salicílico. Se ha reportado que la inoculación en tomate con *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* provocó que aumentaran los niveles de enzimas como peroxidasas y lipoxigenasas ante la presencia de hongos y bacterias patógenas. Se informó un alto nivel de expresión de PO en plantas de pimiento tratadas con *Pseudomonas fluorescens* Pf1 infectadas con *Colletotrichum capsici*. De manera similar, se observó una mayor actividad de PPO en plantas de tomate tratadas con PGPR infectadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Ramamoorthy *et al.*, 2002; Reddy, 2012).

#### **- Otros mecanismos**

Los antibióticos generalmente se consideran compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos por las rizobacterias para inhibir a otros a una concentración muy baja y no suelen acumularse en los ambientes naturales (antibiosis) y juega un papel activo en el biocontrol de enfermedades y plagas de las plantas (Reddy, 2012).

Las rizobacterias también producen sideróforos. Éstos son compuestos extracelulares de bajo peso molecular con una alta afinidad por hierro férrico que facilita su incorporación y se considera que su mecanismo de supresión de nematodos se basa en la competencia por el hierro con el patógeno (Reddy, 2012).

Las proteínas Cry son producidas por algunas especies de *Bacillus* y clasificadas en familias Cry1 a Cry54 sobre la base de su homología de secuencia de aminoácidos. Entre estas 54 familias, Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, Cry21 (Guo *et al.*, 2008), y Cry55 (Frankenhuyzen, 2009) tienen actividad nematocida. Las proteínas Cry causan daño intestinal en nematodos de vida libre y fitófagos (Castaneda-Alvarez & Aballay, 2016).

## 1.4- INTERACCIONES EN LA RIZÓSFERA

Los microorganismos mencionados anteriormente, micorrizas arbúsculares, hongos nematófagos y rizobacterias, se encuentran habitualmente en la naturaleza, muchos de ellos habitan la rizósfera. Dentro de la rizósfera de estas distintas comunidades microbianas con diferentes mecanismos de acción biológicos ya sea mejorando la disponibilidad de nutrientes o inhibiendo el crecimiento de otras comunidades lo mismo que existen diferentes interacciones entre poblaciones microbianas. Las interacciones van a estar dadas por la densidad de poblaciones. Si la densidad es baja no va a haber interacciones negativas o positivas, si la densidad es media o alta puede haber una competencia o cooperación por los recursos disponibles. La cooperación o competencia va a depender del ambiente, de la disponibilidad de nutrientes, del pH y la humedad del suelo, y de los metabolitos o exudados secretados (Hurst, 1997; Albanesi, 2013).

Los distintos tipos de interacción se pueden clasificar en:

### - **Mutualismo:**

El mutualismo es la asociación de dos o más organismos para beneficio mutuo. Esto quiere decir que el crecimiento, la reproducción y el desarrollo suele ser mayor en asociaciones de distintas especies que en una sola como sucede con la interacción PGPR y plantas, en donde se beneficia el crecimiento de las plantas y a su vez el crecimiento y reproducción de las rizobacterias. Otro ejemplo de asociación mutualista es la de la micorrización o sea la simbiosis, una asociación específica entre dos tipos de organismos donde se benefician mutuamente (Fenchel *et al.*, 2012; Albanesi, 2013).

### - **Comensalismo**

Es una asociación de dos especies con beneficio para una de ellas y sin daño ni provecho para la otra. Como ejemplo se puede mencionar a los microorganismos que colonizan la superficie externa de una planta obteniendo energía de la metabolización de exudados producidos por ésta. Otro caso es la influencia favorable de una bacteria facultativa que reduce la cantidad de oxígeno del medio y crea un ambiente adecuado para que prospere una anaeróbica (Hurst, 1997; Albanesi, 2013).

### - **Sinergismo**

Es la asociación interactiva, aunque no obligatoria, entre dos poblaciones de la que ambas resultan beneficiadas. Los HMA y las bacterias actúan sinérgicamente

estimulando el crecimiento de las plantas a través de mecanismos que incluyen una mejor adquisición de nutrientes y la inhibición de patógenos. Las PGPR estimulan el desarrollo radicular provocando una mayor susceptibilidad de la raíz a la colonización de hongos micorrízicos, y la mejora del proceso de reconocimiento entre la raíz y los hongos y a su vez la colonización de las raíces por los hongos micorrízicos arbusculares puede afectar a las comunidades bacterianas asociadas a las raíces en forma directa o indirecta, como el suministro de energía rico en compuestos de carbono, cambios en el pH de la micorrizósfera inducida por el hongo, competencia por nutrientes y la exudación de compuestos inhibidores o estimulantes (Morgan *et al.*, 2005; Sarabia Ochoa *et al.*, 2010).

#### **- Antagonismo**

En este caso, un microorganismo puede producir metabolitos o sustancias que alteren el ambiente de una manera desfavorable para el crecimiento y desarrollo de otros microorganismos o producir su muerte. Los antibióticos son los compuestos más comunes utilizados por los géneros *Bacillus* y *Streptomyces* para inhibir a otros microorganismos (Atlas & Bertha, 2002; Albanesi, 2013).

#### **- Depredación**

La depredación es el ataque de un organismo a otro. Ocurre cuando el predador traga y digiere a la presa. Entre los hongos que capturan nemátodos se hallan *Arthrobotrys* y *Dactylaria*. Solamente en presencia de la presa forman los anillos de hifas constrictoras para la captura y los nemátodos inmovilizados son penetrados por las hifas (Kavanagh, 2011; Singh *et al.*, 2012).

#### **- Parasitismo**

Es la interacción entre organismos, donde el parásito obtiene sus nutrientes del hospedante. Todos los virus son parásitos de bacterias, hongos, algas, plantas y animales. Dentro de los parásitos están los biotrófos que crecen y se multiplican en contacto con el hospedante (infección), los oportunistas y los saprobios que pueden desarrollarse sobre materia orgánica muerta. La mayoría de los organismos parásitos son patógenos de plantas y el desarrollo de la enfermedad está influenciada por la naturaleza de ambos, además de las condiciones ambientales predominantes. Para que ocurra la enfermedad en una planta, el patógeno debe ser virulento y compatible con la

misma (Atlas & Bertha, 2002). Otros parásitos son por ej. Los parasitos de nematodos como *P. lilacinus* y *Pochonia spp.* (Cavello *et al.*, 2015; Albanesi, 2013).

#### **1.4.1- Interacciones para el control biológico.**

Las interacciones que ocurren en la rizósfera y el ambiente son y pueden ser aprovechables para el control biológico de plagas. Dentro de estas interacciones se pueden mencionar el antagonismo ya que hay géneros de rizobacterias que pueden producir antibióticos o como el caso de *B. subtilis* que excreta lipopeptidos que suprimen a los patógenos. Otras interacciones importantes que se producen son la depredación y el parasitismo de distintos géneros de hongos para la colonización y posterior digestión de nematodos. Y el sinergismo que suele haber entre microorganismos para beneficiar a las plantas promoviendo su crecimiento, desarrollo y a su vez otorgándole protección frente a patógenos. Otros mecanismos aprovechables para el control biológico son la competencia por nutrientes y espacio como las que utilizan las micorrizas y *Trichoderma spp.*; la inducción de mecanismos de defensa en las plantas; y en el caso de control contra insectos se puede mencionar a *Bacillus thuringiensis* que libera toxinas para el control de larvas de insectos y nematodos o *Hirsutella* que produce mohos (Atlas & Berta, 2002; Castaneda-Alvarez & Aballay, 2016; Sharma & Sharma, 2017).

En base a todo lo expuesto y a la presentación de todos los microorganismos involucrados en este trabajo, se plantean las siguientes hipótesis y objetivos.

### **1.5- HIPOTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

#### **1.5.1- Hipótesis**

- La infestación de plantas de pimiento con *Nacobbus aberrans* provoca alteraciones morfofisiológicas en el hospedante afectando su crecimiento.
- La interacción de plantas de pimiento con hongos micorrícicos arbusculares, bacterias rizósfericas y/o hongos saprótrofos específicos morigera la actividad fitopatógena de *N. aberrans*, mitigando sus efectos y daños.

#### **1.5.2- Objetivo general**

Controlar la densidad, el potencial reproductivo y la actividad fitófaga de *Nacobbus aberrans* a través de la aplicación de microorganismos antagonistas en el cultivo de pimiento.

### **1.5.3- Objetivos particulares**

1. Evaluar respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que produce el parasitismo por *N. aberrans* en plantas de pimiento.
2. Analizar el potencial de diferentes hongos y bacterias en el control del falso nematodo agallador.
3. Evaluar la respuesta a la inoculación con microorganismos benéficos en plantas de pimiento crecidas en presencia de *N. aberrans*, utilizando parámetros bioquímicos, morfológicos y fisiológicos.
4. Evaluar el efecto de la aplicación de hongos y bacterias con potencial actividad nematicida y/o promotora del crecimiento vegetal sobre la carga de bacterias y hongos asociados al suelo rizosférico de plantas de pimiento crecidas en presencia de *N. aberrans*.
5. Analizar si la combinación de los microorganismos previamente estudiados reduce el efecto antagonista del *N. aberrans* y establecer posibles mecanismos de interacción.

### **1.6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Acosta J. A. (2006). Evaluación de hongos entomopatógenos como controladores biológicos de *Scutigerella immaculata* (trabajo de grado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 79 p.

Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, New York.

Adlercreutz, E. A., Chaves, E., Mondino, A., & Szczesny. (2007). Fluctuación poblacional de juveniles del segundo estadio de *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne sp.* bajo condiciones de invernáculos (Período Sept. 2004 / Oct. 2007). INTA. 2pp.

Akiyama, K., Matsuzaki, K., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435, 824 – 827.

Albanesi, A. S. (2013). Microbiología Agrícola. Un aporte de la Investigación en Argentina. 2a. ed.

Alonso A., Fuentes M., Porta M. S., Saavedra J., & Ysa L. (2016). “El Peligro de los agrotóxicos: entre el Trabajo y la Salud” Trabajo final. Medicina Social. Facultad de Trabajo Social, UNLP. Fuente: <https://nematode.unl.edu/naberra.htm>.

Andrés, M. F. (2003). Nemátodos parásitos de plantas en suelos agrícolas. Phytoma España: *La revista profesional de sanidad vegetal*, (149), 33-42.

Atlas, R. M., & Bartha, R. (2002). Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4° ed. Addison Wesley, Madrid.

Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778.

Barron, G. L., & Thorn, R. G. (1987). Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Canadian Journal of Botany*, 65(4), 774-778.

Baum, C., El-Tohamy, W., & Gruda, N. (2015). Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Scientia horticulturae*, 187, 131-141.

Beltrano, J., Ruscitti, M., Arango, M. C., & Ronco, M. (2013). Effects of arbuscular mycorrhiza inoculation on plant growth, biological and physiological parameters and mineral nutrition in pepper grown under different salinity and p levels. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(1), 123-141.

Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35(4), 1044-1051.

Bharwana, S. A., Ali, S., Farooq, M. A., Iqbal, N., Hameed, A., Abbas, F., & Ahmad, M. S. A. (2014). Glycine betaine-induced lead toxicity tolerance related to elevated photosynthesis, antioxidant enzymes suppressed lead uptake and oxidative stress in cotton. *Turkish Journal of Botany*, 38(2), 281-292.

Blandi, M. L., Rigotto, M. R., & Sarandón, S. J. (2015). Impactos de la modernización tecnológica sobre dimensiones contextuales en el cinturón hortícola platense. In *V Congreso Latinoamericano de Agroecología (La Plata)*.

Bowen, G. D. (1987). The biology and physiology of infection and its development.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brand, D., Roussos, S., Pandey, A., Zilioli, P. C., Pohl, J., & Soccol, C. R. (2004). Development of a bionematicide with *Paecilomyces lilacinus* to control *Meloidogyne incognita*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 118(1), 81-88.
- Cantrell, I. C., & Linderman, R. G. (2001). Preinoculation of lettuce and onion with VA mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. *Plant and Soil*, 233(2), 269-281.
- Castaneda-Alvarez, C., Prodan, S., Rosales, I. M., & Aballay, E. (2016). Exoenzymes and metabolites related to the nematicidal effect of rhizobacteria on *Xiphinema index* Thorne & Allen. *Journal of applied microbiology*, 120(2), 413-424.
- Castaneda-Alvarez, C., & Aballay, E. (2016). Rhizobacteria with nematicide aptitude: enzymes and compounds associated. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(12), 1-7.
- Castillo, P. & Volvas, N. (2007). *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae); Diagnosis, biology, pathogenicity and management. Nematology Monographs and Perspectives 6. Leiden, The Netherlands, Brill, 529 pp.
- Cavello, I. A., Crespo, J. M., García, S. S., Zapiola, J. M., Luna, M. F., & Cavalitto, S. F. (2015). Plant growth promotion activity of keratinolytic fungi growing on a recalcitrant waste known as "Hair Waste". *Biotechnology research international*, 2015.
- Chang, S. T., & Miles, P. G. (2014). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. CRC press.
- Chen, J., Ferris, H., Scow, K. M., & Graham, K. J. (2001). Fatty acid composition and dynamics of selected fungal-feeding nematodes and fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 130(2), 135-144.
- Colamarino I., Curcio N., Ocampo F., & del Torran C. (2006). La producción hortícola en la Argentina, SAGPyA.
- Correa Gutierrez, P. (2011). Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento de microorganismos extraídos de suelos supresivos sobre plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y su influencia en la calidad de plántula. Trabajo monográfico. Escuela Superior de Ingeniería. Universidad de Almería.

Cristóbal, A. J., del Prado, I. C., Marbán-Mendoza, N., Sánchez, G. P., Mora-Aguilera, G., & Manzanilla, L. R. H. (2001). Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. *Nematropica*, 227-234.

Decraemer, W., & Hunt, D. J. (2006). Structure and classification. *Plant nematology*, 3-32.

de Marchese, A. M., & Filippone, M. P. (2018). Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible: Bio-products: key components of sustainable agriculture. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 38(1), 9-21.

del Pino, M. 2016. Guía didáctica: Cultivo y Manejo del Pimiento. Horticultura y Floricultura. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. Disponible en: [www.agro.unlp.edu.ar/cursos/mod/folder/view.php?id=11386](http://www.agro.unlp.edu.ar/cursos/mod/folder/view.php?id=11386).

Dickson, S. (2004). The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*. 161,187-200.

Doucet, M. E., & De Doucet, M. M. A. (1997). Nematodes and agriculture in continental Argentina. An overview. *Fundamental and applied nematology*, 20(6), 521-540.

Doucet, M. E., & Lax, P. (2005). El género *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 en la Argentina. 6.

Duncan, L. W., & Moens, M. (2006). Migratory endoparasitic nematodes. *Plant nematology*, 123-152.

El-Khallal, S. M. (2007). Induction and modulation of resistance in tomato plants against Fusarium wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid and salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. *Australian Journal of Basic Applied Science*, 1(4), 717-732.

Enebe, M. C., & Babalola, O. O. (2018). The influence of plant growth-promoting rhizobacteria in plant tolerance to abiotic stress: a survival strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7821-7835.

EPPO. (2019). PQR-EPPO Database on Quarantine Pests. available online. <http://www.eppo.int>.

Fenchel, T., Blackburn, H., King, G. M., & Blackburn, T. H. (2012). *Bacterial biogeochemistry: the ecophysiology of mineral cycling*. Academic press.

- Finlay, R. D. (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany*, 59, 1115-1126.
- Flores-Camacho, R., Atkins, S. D., Manzanilla-López, R. H., Prado-Vera, I. C. D., & Martínez-Garza, Á. (2008). Caracterización de aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare para el control biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(2), 93-104.
- Froni, L. (2006). Microbiología, básica, ambiental y agrícola, Lillian Froni. 291-308.
- García, M. (2012). Análisis de las transformaciones de la estructura agraria hortícola platense en los últimos 20 años (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- García, M. (2015). Horticultura de La Plata (Buenos Aires): Modelo productivo irracionalmente exitoso.
- Garita, S. A. (2020). Herramientas biológicas: Un aporte para elaboración de un plan de manejo de *Nacobbus aberrans*. (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Genier, H. L. A., de Freitas Soares, F. E., de Queiroz, J. H., de Souza Gouveia, A., Araújo, J. V., Braga, F. R., & Kasuya, M. C. M. (2015). Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. *African Journal of Biotechnology*, 14(17), 1496-1503.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., & Barker, D. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell*, 17(12), 3489-3499.
- Ghaderian, S. M., & Ravandi, A. A. G. (2012). Accumulation of copper and other heavy metals by plants growing on Sarcheshmeh copper mining area, Iran. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 25-32.
- Gheysen, G., & Mitchum, M. G. (2011). How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Current opinion in plant biology*, 14(4), 415-421.
- Gianinazzi-Pearson, V., van Tuinen, D., Dumas-Gaudot, E., & Dulieu, H. (2001). Exploring the genome of Glomalean fungi. En: Hock, B. (Ed.) *The Mycota IX. Fungal Associations* (3-17). Berlin. Springer-Verlag.

- Gómez, M. R., & Villate, A. R. (2010). Señales de reconocimiento entre plantas y hongos formadores de micorrizas arbusculares. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 11(1), 53-60.
- Gortari, M. C., & Hours, R. A. (2016). Conidial production of *Purpureocillium lilacinum* LPSC# 876 on solid substrates. Effect on *Nacobbus aberrans* in tomato plants. *Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata)*, 115(2), 239-249.
- Gortari, M. C., & Hours, R. A. (2019). In vitro antagonistic activity of Argentinean isolates of *Purpureocillium lilacinum* on *Nacobbus aberrans* eggs. *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)*, 9(1), 164-174.
- Gramuglia, P. (2014). Bioinsumos en Argentina: hacia la sustentabilidad ambiental. *Anuario en Relaciones Internacionales del IRI*, 2014.
- Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil biology and biochemistry*, 37(3), 395-412.
- Guillon, C., St-Arnaud, M., Hamel, C., & Jabaji-Hare, S. (2002). Differential and systemic alteration of defence-related gene transcript levels in mycorrhizal bean plants infected with *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Botany*, 80(3), 305-315.
- Guo, S., Liu, M., Peng, D., Ji, S., Wang, P., Yu, Z., & Sun, M. (2008). New strategy for isolating novel nematicidal crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain YBT-1518. *Applied and environmental microbiology*, 74(22), 6997-7001.
- Gupta, A. S., Webb, R. P., Holaday, A. S., & Allen, R. D. (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants). *Plant Physiology*, 103(4), 1067-1073.
- Guzmán, G. (2000). Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetideae): diversity, taxonomic problems, and cultural and traditional medicinal uses. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2(2).
- Hang, G. M., Larrañaga, G. F., Seibane, C. I., Bravo, M. L., Ferraris, G., Kebat, C. A., Blanco, V., & Otaño, M. (2009). Caracterización de los sistemas de producción hortícola en el municipio de La Plata – Argentina. Análisis dinámico desde una perspectiva cualitativa. *Agronomía*, 17(2), 59 - 67.

- Hao, L., Thein, M., Brust-Mascher, I., Civelekoglu-Scholey, G., Lu, Y., Acar, S., Prevo, B., Shaham, S., & Scholey, J. M. (2011). Intraflagellar transport delivers tubulin isoforms to sensory cilium middle and distal segments. *Nature Cell Biology*, 13, 790-798.
- Hashem, M., & Abo-Elyousr, K. A. (2011). Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. *Crop Protection*, 30(3), 285-292.
- Hause, B., Mrosk, C., Isayenkova, S., & Dieter, S. (2007). Jasmonates in Arbuscular Mycorrhizal Interactions. *Phytochemistry*, 68, 101-110.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of microbiology*, 60(4), 579-598.
- Hernández, M. A., & Hidalgo Díaz, L. (2008). KlamiC®: Bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. *Revista de Protección Vegetal*, 23(2), 131-134.
- Hernández Anguiano, A. M., Zavaleta-Mejía, E., & Carrillo, G. (1992). Efecto de *Nacobbus aberrans* (Thorne y Allen, 1944) en la infección de *Phytophthora capsici* Leo. en Chile. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 10, 166-174.
- Hewitt, W. B. (1985). From virus-like to virus diseases of grapevines: some unresolved problems including immunity and ideas for researching them. *Phytopathologia Mediterranea*, 1-7.
- Hibbett, D. S., & Thorn, R. G. (1994). Nematode-trapping in *Pleurotus tuberregium*. *Mycologia*, 86(5), 696-699.
- Hurst, J. (1997). ed. Manual of Environmental Microbiology. ASM Press, Washington.
- INDEC. (2010). Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010.
- Inglis, P. W., Tigano, M. S., & Valadares-Inglis, M. C. (1999). Transformation of the entomopathogenic fungi, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces lilacinus* (deuteromycotina: hyphomycetes) to benomyl resistance. *Genetics and molecular biology*, 22(1), 119-123.
- Inserra, R. N., Vovlas, N., Griffin, G. D., & Anderson, J. L. (1983). Development of the false root-knot nematode, *Nacobbus aberrans*, on sugarbeet. *Journal of Nematology*, 15(2), 288.
- Janssen, P. A., & van den Bossche, H. U. G. O. (1982). Treatment of helminthiasis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplement*. 36, 52.

- Jatala, P. (1985). El nematodo falso nodulador de la raíz: *Nacobbus aberrans*.
- Jelly, N. S., Schellenbaum, P., Walter, B., & Maillot, P. (2012). Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos. *Transgenic research*, 21(6), 1319-1327.
- Jones, D. L., Hodge, A., & Kuzyakov, Y. (2004). Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New phytologist*, 163(3), 459-480.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 14(9), 946-961.
- Kavanagh, K. (2011). *Fungi: Biology and Applications*. 2° ed. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Kaya, C., Ashraf, M., Sonmez, O., Aydemir, S., Levent Tuna, A., & Ali Cullu, M. (2009). The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horticulturae*, 121:1-6
- Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M. A., & Kecskés, M. L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited?. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1229-1244.
- Kloepper, J. W., & Schroth, M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In *Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France, 1978* (Vol. 2, pp. 879-882).
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Zablutowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in biotechnology*, 7(2), 39-44.
- Kwok, O. C. H., Plattner, R., Weisleder, D., & Wicklow, D. T. (1992). A nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. *Journal of Chemical Ecology*, 18(2), 127-136.
- Lambais, M., F. Rãos-Ruiz, W. M., & Andrade, R. (2003). Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 160, 421-428.
- Lax, P., Gonzalez-Ittig, R. E., Rondan Duenas, J. C., Andrade, A. J., Gardenal, C. N., Franco, J., & Doucet, M. E. (2021). Decrypting species in the *Nacobbus aberrans* (Nematoda: Pratylenchidae) complex using integrative taxonomy. *Zoologica Scripta*, 50(5), 667-688.

Lilley, C. J., Kyndt, T., & Gheysen, G. (2011). Nematode resistant GM crops in industrialised and developing countries. In *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions* (pp. 517-541). Springer, Dordrecht.

Linderman, R. G. (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizae on the presence of arbuscular mycorrhizal spores in a hiza and soil microbial interactions. Mycorrhizal long-term field experiment. *Swedish J. agric. hiza in sustainable agriculture*. Ed. GJ Bethlen-Res, 24, 157- 164.

Lioussanne, L., Jolicoeur, M., & St-Arnaud, M. (2008). Mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices* and development stage of transformed tomato roots significantly modify the chemotactic response of zoospores of the pathogen *Phytophthora nicotianae*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 2217-2224.

López-Martínez, N., Colinas-León, M., Peña-Valdivia, C. B., Salinas-Moreno, Y., Fuentes-Montiel, P., Biesaga, M., & Zavaleta-Mejía, E. (2011). Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant and soil*, 338(1), 399-409.

López-Ráez, J. A., Verhage, A., Fenández, I., García, J. M., Azcón-Aguilar, C., Flors, V., & Pozo, M. J. (2010). Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental of Botany*, 61, 2589-2601.

MAGyP (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación) (2014). Comisión nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA). Ámbito de actuación, reglamento interno y normativa conexas. 55p.

Mai, W., Brodie, B., Harrison, M., & Jatala, P. (1981). Nematodos. En: Compendium of Potato Diseases. Hooker, W. J (ed). *American Phytopathological Society*, 93: 101.

Manzanilla-López, R. H., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R. N., Lehman, P. S., & Evans, K. (2002). The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica*, 149-228.

Marlin, M., Wolf, A., Alomran, M., Carta, L., & Newcombe, G. (2019). Nematophagous *Pleurotus* species consume some nematode species but are themselves consumed by others. *Forests*, 10(5), 404.

MBTOC (Methyl Bromide Technical Options Comite) (1994). Report of the methyl bromide technical options committee. Montreal protocol on substances that deplet the ozone layer, UNEP, Kenya, 304.

Mendes, R. (2012). Microbioma da rizosfera e proteção de plantas. In *Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: Congresso Paulista De Fitopatologia, 35. Jaguariúna. Anais Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 38, 2012.

Mitiku, M. (2018). Plant-parasitic nematodes and their management: A review. *Agricultural Research & Technology*, 8, 30-38.

Moreno, A. F. (1961). Nematodos que perjudican cultivos de interés económico. *Informativo de Investigación Agropecuaria*, n. 163, p. 30-32.

Morgan, J. A. W., Bending, G. D., & White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1729-1739.

Mukhtar, T., Arshad Hussain, M., & Zameer Kayani, M. (2013). Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra. *Phytopathologia Mediterranea*, 66-76.

Nico, A. I. (2014). Nematodos patógenos de las plantas en el área del cinturón hortícola de la Plata: Situación actual y esfuerzos por abordar el problema desde una perspectiva sustentable. Congreso Argentino de Fitopatología, Tucumán, Argentina. 2014.

Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., Nijs, L. D., Hockland, S., & Maafi, Z. T. (2011). Current nematode threats to world agriculture. In *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions* (pp. 21-43). Springer, Dordrecht.

Nicolson, T. H. (1959). Mycorrhiza in the Gramineae: I. Vesicular-arbuscular endophytes, with special reference to the external phase. *Transactions of the British Mycological Society*, 42(4), 421-IN3.

Nordbring-Hertz, B., Neumeister, H., Sjollem, K., & Veenhuis, M. (1995). A conidial trap-forming mutant of *Arthrobotrys oligospora*. *Mycological Research*, 99(11), 1395-1398.

Nordbring-Hertz, B. (2004). Morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*-an extensive plasticity of infection structures. *Mycologist*, 18(3), 125-133.

- Nose, M., & Shiraishi, S. (2008). Breeding for resistance to pine wilt disease. In *Pine wilt disease* (pp. 334-350). Springer, Tokyo.
- Odelade, K. A., & Babalola, O. O. (2019). Bacteria, fungi and archaea domains in rhizospheric soil and their effects in enhancing agricultural productivity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(20), 3873.
- Page, A. P., Stepek, G., Winter, A. D., & Pertab, D. (2014). Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target?. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(2), 133-141.
- Pagter, M., Bragato, C., & Brix, H. (2005). Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. *Aquatic Botany*, 81(4), 285-299.
- Piedra-Naranjo, R. (2008). Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias. *Revista Tecnología en Marcha*, 21(1), ág-123.
- Podile, A. R., & Kishore, G. K. (2006). Plant-associated bacteria. *Plant growth promoting rhizobacteria*. Springer, Amsterdam, 195-230.
- Pozo, M. J., Jung, S. C., López-Ráez, J. A., & Azcón-Aguilar, C. (2010) Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: The role of plant defence mechanisms. In: H. Koltai and Y. Kapulnik (eds.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, 193–207. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Puente, M., García, J., Rubio, E., & Peticari, A. (2010). Microorganismos promotores del crecimiento vegetal empleados como inoculantes en trigo. *INTA–Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicación Miscelánea*, (116).
- Quilambo, O. A. (2003). The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 539-546.
- Ramamoorthy, V., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2002). Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent *Pseudomonas*. *European journal of plant pathology*, 108(5), 429-441.
- Ramírez Gómez, M., & Rodríguez, A. (2012). Plant defense mechanisms and responses in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: a review. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 271-284.
- Reddy, P. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In *Recent advances in crop protection* (pp. 131-158). Springer, New Delhi.

- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil*, 321(1), 305-339.
- Rinaudi, L. V., & Giordano, W. (2010). Bacterial Biofilms: Role in Rhizobium–Legume Symbiosis. In *Microbes for legume improvement* (pp. 325-335). Springer, Vienna.
- Rodriguez-Kabana, R. (1991). Nematological Review: Control Biológico de Nematodos Parasitos de Plantas. *Nematopica*, 21(1), 111-122.
- Ruscitti, M. F., Arango, M. C., Ronco, M. G., Peluso, O., & Beltrano, J. (2007). Efecto del estrés hídrico simulado y la inoculación con esporas de *Glomus mosseae* sobre el crecimiento y la partición de biomasa en avena. *Terra Latinoamericana*, 25(2), 135-143.
- Ruscitti, M., Arango, M., Ronco, M., & Beltrano, J. (2011). Inoculation with mycorrhizal fungi modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23, 15-25.
- Ruscitti, M., & Saparrat, M. (2020). Capítulo 2 ¿Cómo se establece la simbiosis?. Libro de Catedra *Micorrizas arbusculares*, 36.
- Sagüés, M. F., Purslow, P., Fernández, S., Fusé, L., Iglesias, L., & Saumell, C. (2011). Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(4), 143-147.
- Sánchez, J. E., & Royse, D. J. (2001). La biología y el cultivo de *Pleurotus spp* (No. 635.8 S211b). México, MX: Limusa.
- Sánchez Delgado, G. A. (2010). Comportamiento de las principales variedades comerciales de Tomate de Mesa (*Lycopersicum Sculentum* Mill) al parasitismo de los nematodos “Nudo de la Raíz”( *Meloidogyne Incognita*) y “Rosario de la Raíz”( *Nacobbus Aberrans*) en Ibarra-Imbabura (Bachelor's thesis).
- Sánchez Portillo, J. F. (2010). Efecto de quitina y quitosano sobre huevos y juveniles de nemátodos formadores de nódulos radiculares, *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita* bajo condiciones de in vitro e in vivo (Master's thesis).
- Sarabia Ochoa, M. C., Madrigal, R. P., Martínez, M. T., & Carreón, A. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65-71.

- Schouteden, N., De Waele, D., Panis, B., & Vos, C. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant-parasitic nematodes: a review of the mechanisms involved. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1280.
- Sharma, A. K., & Johri, B. N. (2002). Arbuscular mycorrhizae: interactions in plants, rhizosphere, and soils (No. Sirsi) i9781578082063).
- Siddiqi, M. R. (2000). *Tylenchida: parasites of plants and insects*. CABI.
- Sierra Monroy, J. A. Evaluación de la acción nematocida in vitro e in vivo de especies de *Pleurotus spp.*, sobre los nematodos *Meloidogyne spp.* y *Radopholus spp.* asociados a los cultivos de tomate y plátano. *Maestría Ciencias Agrarias*.
- Silva, E. N. D., Ribeiro, R. V., Ferreira-Silva, S. L., Viégas, R. A., & Silveira, J. A. G. (2011). Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. *Scientia Agricola*, 68(1), 62-68.
- Singh, U. B., Sahu, A., Singh, R. K., Singh, D. P., Meena, K. K., Srivastava, J. S., & Manna, M. C. (2012). Evaluation of biocontrol potential of *Arthrobotrys oligospora* against *Meloidogyne graminicola* and *Rhizoctonia solani* in Rice (*Oryza sativa* L.). *Biological control*, 60(3), 262-270.
- Šircelj, H., Tausz, M., Grill, D., & Batič, F. (2005). Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. *Journal of plant physiology*, 162(12), 1308-1318.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. 3ra edición. New York. Academic Press.
- Stavisky, A. (2010). Situación actual de la plasticultura en Argentina. En XXXIII Congreso Argentino de Horticultura. Rosario: Asociación Argentina de Horticultura (ASAHO).
- Steinkellner, S., Lenzemo, V., Langer, I., Schweiger, P., Khaosaad, T., Toussaint, J. P., & Vierheilig, H. (2007). Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules*, 12(7), 1290-1306.
- Subedi, P., Gattoni, K., Liu, W., Lawrence, K. S., & Park, S. W. (2020). Current utility of plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents towards plant-parasitic nematodes. *Plants*, 9(9), 1167.
- Taylor, A. L., & Sasser, J. N. (1983). Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. *Universidad de Carolina del Norte*, 111.

- Turner, S. J., & Rowe, J. A. (2006). Cyst Nematodes, 93-122. *Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology* (Eds. GAM Nikki & J. Marks). CAB International, Wallingford, England, 53-71.
- Valdés, F. E., Abarca, C., Colombo, R. P., & Silvani, V. A. (2020). Capítulo 1: Introducción y generalidades. *Libro de cátedra Micorrizas arbúsculares*, 11.
- Van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of invertebrate pathology*, 101(1), 1-16.
- Van Wees, S. C., Van der Ent, S., & Pieterse, C. M. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current opinion in plant biology*, 11(4), 443-448.
- Varela-Benavides, I., Durán-Mora, J., & Guzmán-Hernández, T. (2017). Evaluación in vitro de diez cepas de hongos nematófagos para el control de *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne incognita* y *Radopholus similis*. *Revista Tecnología en Marcha*, 30(1), 27-37.
- Vos, C., Claerhout, S., Mkandawire, R., Panis, B., De Waele, D., & Elsen, A. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi reduced root-knot nematode penetrations through altered root exudation of their host. *Plant Soil*, 354, 335-345.
- Vos, C. M., Yang, Y., De Coninck, B., & Cammue, B. P. A. (2014). Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biological Control*, 74, 65–81.
- Wang, B., & Qiu, Y. L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16(5), 299-363.
- Yang, J., Yu, Y., Li, J., Zhu, W., Geng, Z., Jiang, D., & Zhang, K. Q. (2013). Characterization and functional analyses of the chitinase-encoding genes in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Archives of microbiology*, 195(7), 453-462.

**CAPÍTULO 2**  
**Alteraciones morfofisiológicas y estrés oxidativo  
causado por *Nacobbus aberrans* en plantas de  
pimiento.**

## 2.1- INTRODUCCIÓN

El ciclo de vida de *N. aberrans* está formado por: un estadio de huevo, seguido por 4 estadios larvales o juveniles y un estadio adulto, como se mencionó anteriormente. En el interior del huevo se forma el primer estado juvenil y la primera muda ocurre en el interior del huevo para dar lugar al juvenil de segundo estadio (J2). En condiciones adecuadas (temperaturas altas, humedad) el J2 emergerá al suelo. Luego de esto pueden suceder dos cosas:

- entrar en la raíz de un hospedero y salir repetidas veces, hasta llegar al estadio adulto;
- entrar a la raíz y alcanzar la etapa adulta allí dentro (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Doucet & Lax, 2005)

Es por estas características que *Nacobbus* es el único caso conocido que reúne en su ciclo de vida los mecanismos típicos de los nematodos endoparásitos migradores y de los nematodos endoparásitos sedentarios (Eves-Van Den Akker *et al.*, 2014). Si bien presenta la particularidad de formar agallas, antes de formar los sitios de alimentación (Sincito) y asentarse, muestra un hábito migratorio intracelular. El juvenil de tercer estadio (J3) inicialmente se parece al J2 pero al alimentarse su cuerpo aumenta de tamaño y tiende a adoptar una forma de "C" (Manzanilla-López *et al.*, 2002). La muda de J4 a adulto puede tener lugar en el suelo o en la raíz. La hembra inmadura se fija en la proximidad del cilindro central donde induce la formación de su sitio de alimentación. Estas hembras pierden su forma filiforme y se tornan voluminosas por el desarrollo de los huevos en su interior (Manzanilla-López *et al.*, 2002). El daño que causan los estados juveniles con la entrada y salida de la planta huésped son laceraciones en la raíz, que suelen ser puerta de entrada a otros patógenos del suelo, y daños en los tejidos del parénquima que terminan por lograr una necrosis generalizada de la raíz (Schuster *et al.*, 1965). Las hembras maduras de *N. aberrans* crecen en volumen y con la formación del sincitio dan como resultado la formación de agallas, síntoma visible de los nematodos noduladores. Otros síntomas visibles que se pueden observar en cultivos afectados por *N. aberrans* son reducción y retraso del crecimiento apical, clorosis, enrollado de los márgenes foliares y marchitamiento en las plantas que suelen disponerse en manchones en los cultivos bajo invernáculo o a campo, además de que pueden provocar la muerte del cultivo. Suele haber también una baja en el rendimiento

debido a frutos de menor tamaño o con deformaciones (Doucet & Lax, 2005). Las alteraciones causadas por las hembras sedentarias y los daños producidos en las raíces por entradas y salidas reiteradas de los juveniles (Manzanilla- Lopez *et al.*, 2002) como laceraciones y necrosis, afectan la integridad celular y la capacidad de retención de sustancias intracelulares, razón por la cual se incrementa la conductividad relativa de los tejidos por la salida de electrolitos (Beltrano *et al.*, 2013). Estos daños se observan también ante factores ambientales adversos y situaciones de estrés.

El estrés por deficiencia de agua y nutrientes produce alteraciones en diferentes procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas, como en las relaciones hídricas (Silva *et al.* 2011), el intercambio gaseoso (Pagter *et al.*, 2005) y el metabolismo de los carbohidratos, proteínas, aminoácidos y otros compuestos orgánicos (Šircelj *et al.*, 2005). Como consecuencia de estos efectos suelen ocurrir otros estreses secundarios, como el estrés oxidativo.

## **2.2- OBJETIVO**

Evaluar respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que produce el parasitismo por *N. aberrans* en plantas de pimiento

## **2.3- ENSAYO EXPERIMENTAL**

### **- Materiales y métodos**

El trabajo experimental se realizó en invernáculo en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (34°S, 58°O) (UNLP) entre los meses de agosto y diciembre. Se sembraron semillas de pimiento *Capsicum annum* L. Paco F1, variedad de uso habitual entre los productores de la zona, previamente desinfectadas con NaOCl (10%) durante 5 minutos, en bandejas speedlings de 72 celdas. El sustrato utilizado para llenar las celdas estaba formado por una mezcla de perlita:vermiculita (1:1 v/v) previamente autoclavado. Las bandejas fueron mantenidas en cámara de cultivo hasta el trasplante y la provisión de nutrientes se realizó semanalmente utilizando la solución nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). Treinta días después de la siembra (DDS), se realizó el trasplante a macetas de 10 kg con una mezcla de tierra:arena (1:1 v/v) tinalizada durante tres días consecutivos. Tres días después del trasplante (DDT) se inocularon la mitad de las macetas con 8000 huevos de *Nacobbus aberrans*. La suspensión de huevos empleada como inóculo se obtuvo utilizando la técnica de centrifugación-flotación (Coolen, 1979) a partir de un

cultivo monoxénico obtenido a partir de una única masa de huevos proveniente de raíces de plantas infectadas aisladas de un invernáculo del Cinturón Hortícola Platense. Para la inoculación se realizaron tres orificios de 2 cm de profundidad en el sustrato, próximos a la plántula y se aplicó la suspensión de huevos con el uso de una micropipeta. De esta forma quedaron definidos los siguientes tratamientos:

1. Plantas de pimiento no inoculadas (control)
2. Plantas de pimiento inoculadas con *Nacobbus aberrans* (inoculado).



**Imagen 2.1:** a- Plantas de pimiento en speedling. b- Plantas de pimiento en macetas de 10 Kg (Imagen propia).

Siete DDT se iniciaron las mediciones semanales de altura y diámetro del tallo (calibre). Al finalizar el ensayo, 120 DDT, se tomaron muestras de la parte aérea y de la raíz.

Para facilitar el análisis de los resultados, éstos fueron organizados en 3 grupos: indicadores que analizan la población del nematodo; parámetros de crecimiento y desempeño fisiológico e indicadores de estrés en las plantas.

#### Indicadores de población de nematodos:

- Extracción de huevos de nematodos de las raíces mediante el método de Hussey & Barker (1973).

El objetivo de esta técnica es extraer y disolver las masas de huevos que se encuentran en las raíces. Para ello las raíces se cortaron con tijera en segmentos de 10 cm de largo y se las colocó en una licuadora. Se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% hasta cubrir la totalidad de las raíces y se licuó a la velocidad máxima durante un minuto. Se vertió la suspensión sobre dos tamices superpuestos, colocando en la parte superior el tamiz de 150  $\mu\text{m}$  de apertura de malla y en la inferior, el de 37  $\mu\text{m}$ . Se enjuagó el tamiz inferior y se recolectó el material donde se encontraban los huevos. Esta técnica se combinó con la de técnica de centrifugación – flotación de Coolen (1979) para clarificar la suspensión y facilitar el recuento de huevos en microscopio óptico.

- Método de centrifugación flotación para la separación y purificación de nematodos mediante el método de Coolen (1979).

Para poder facilitar el conteo de huevos obtenidos de las raíces por la técnica de Hussey & Barker (1973) se aplicó sobre la suspensión de huevos la técnica de centrifugación-flotación descrita por Coolen (1979). A la suspensión de huevos, se le adicionó 5  $\text{cm}^3$  de caolín por cada 50  $\text{cm}^3$  de suspensión. Se agitó hasta lograr una mezcla homogénea y se distribuyó en tubos de centrífuga. Se realizó una primera centrifugación durante 5 minutos a 1000g. Finalizada la centrifugación el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido con una solución de sacarosa con densidad 1,18 gr/L (484 gr de azúcar comercial en un litro de agua). Con ayuda de una columna de vidrio, se mezcló la sacarosa con el pellet hasta lograr una mezcla homogénea. Luego se procedió a realizar una segunda centrifugación a 1000g durante 2 minutos. Finalmente se vertió el sobrenadante sobre un tamiz de 37  $\mu\text{m}$  debajo del grifo para “lavar” los huevos y retirar la sacarosa. El contenido del tamiz fue colocado en vasos de precipitado para su posterior recuento sobre placa de conteo en microscopio óptico.

- Factor de reproducción del nematodo (Oostenbrink, 1966).

Se calculará en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Fr} = \text{Pf} \cdot \text{Pi}^{-1}$$

Donde:

Fr: Factor de reproducción

Pf: Población final

Pi: Población inicial inoculada

Siendo que plantas con  $\text{Fr} = 1$  son consideradas inmunes; con  $\text{Fr} < 1$  resistentes; y  $\text{Fr} > 1$  susceptibles.

### Determinación de parámetros morfofisiológicos y de crecimiento

- Cortes histológicos de tejido radicular (Zarlavsky, 2014; Gurr, 1971).

Se realizaron cortes transversales a mano alzada de las raíces. Los cortes fueron decolorados con hipoclorito de sodio (50%), lavados con agua destilada y se practicó una doble coloración con azul de Alcian 1% y safranina alcohólica 80% (Luque *et al.*, 1996). Se practicaron técnicas histoquímicas para identificar almidón con solución acuosa de Lugol (iodo-iodurado de potasio) (Zarlavsky, 2014) y para sustancias lipofílicas se empleó una solución alcohólica saturada de Red Oil “O” (Gurr, 1971). La presencia de lípidos quedó indicada por el color rojo (paredes impregnadas con suberina, cutina). Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico Ceti TopicT y la captura de imágenes con un microscopio Gemalux XSZ-H equipado con cámara Motic 1000 y software Motic Image Plus 2.0.

- Peso seco aéreo y de raíz.

Al finalizar el ensayo se determinó el peso seco aéreo y de raíz, luego de secar el material en estufa a 80°C hasta peso constante.

- Determinación del contenido de clorofila según el método de Wellburn (1994)

El contenido de clorofila y carotenoides se determinó a partir de un disco de hoja de 1 cm de diámetro. Se utilizó N, N-Dimetilformamida como solvente de extracción, determinando la absorbancia de la solución a las longitudes de onda 647, 664 y 480 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 A. El cálculo del contenido de pigmentos se realizó de acuerdo a Wellburn, (1994) con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g cm}^{-2}) = 12 \times \text{Ab}_{663.8} - 3.11 \times \text{Ab}_{646.8}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g cm}^{-2}) = 20.78 \times \text{Ab}_{646.8} - 4.88 \times \text{Ab}_{663.8}$$

$$\text{C total a+b } (\mu\text{g cm}^{-2}) = 17.67 \times \text{Ab}_{646.8} + 7.12 \times \text{Ab}_{663.8}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g cm}^{-2}) = (1000 \times \text{Ab}_{480} - 1.12 \text{ Ca} - 34.07 \text{ Cb}) / 245$$

- Determinación del contenido de proteínas solubles mediante el método de Bradford, (1976).

El contenido de proteínas solubles se determinó a partir de 100 mg de la última hoja expandida e igual peso de raíz, de acuerdo al método de Bradford (1976). Los tejidos se homogeneizaron en un mortero con 1 ml del buffer de extracción (TRIS 50 mM, EDTA 1mM, PVPP insoluble 1%, MeSH 0,1% a pH 7,5) a 4°C. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante

y se le agregó 5 ml del reactivo Azul Brillante de Coomassie, se agitó en vórtex y se leyó la absorbancia a 595 nm. El cálculo de la concentración de proteínas se efectuó empleando una curva patrón preparada con distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA, SiFMa Chemical Co).

- Fotosíntesis neta (PN), transpiración (E) y conductancia estomática (G)

Se determinaron utilizando un analizador de gases infrarrojos portátil (modelo CIRAS-2®, PP Systems), que estima la asimilación neta de CO<sub>2</sub> expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Las mediciones fueron realizadas a 25°C con una concentración de CO<sub>2</sub> externo de 360 ppm y 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de irradiancia. A partir de estos datos se calculó la eficiencia en el uso de agua (EUA).

#### Determinación de parámetros de estrés

- Determinación del contenido de prolina mediante el método de Bates *et al.* (1973).

Para la determinación de prolina se homogeneizaron 100 mg de material fresco de hoja y de raíz con 2 ml de una solución en agua al 3% de ácido sulfosalicílico. El homogeneizado se centrifugó a 12000 g por 15 minutos y se tomó 1 ml del extracto obtenido. Se lo hizo reaccionar con 1 ml del reactivo Ninhydrina ácida y 1 ml de ácido acético glacial en un tubo de 15 ml, en baño maría a 100 °C durante una hora. Al cabo de ese lapso la reacción se interrumpió enfriando el tubo rápidamente. A la mezcla reaccionante anterior se le agregó 2 ml de tolueno y se agitó durante 15 a 20 segundos en vórtex. Se dejaron separar las fases y se tomó la fase acuosa conteniendo el cromóforo tolueno-prolina y se leyó la absorbancia a 520 nm usando tolueno como blanco.

Se calculó el contenido de prolina por unidad de peso fresco según:

$$\mu\text{mol prolina.g}^{-1} \text{ PF} = [(\mu\text{g prolina/ml} \times \text{ml tolueno})/115,5 \mu\text{g}/\mu\text{moles}]/[(\text{g PF})/5]$$

- Contenido de Azúcares totales y reductores mediante el método de Cronin & Smith (1979).

La determinación del contenido azúcares totales y reductores se realizó de acuerdo a Cronin & Smith (1979). Primero se preparó el extracto a partir de muestras de 500 g de hojas y de raíces, se mortearon con 10 ml de alcohol 85 ° y calentaron a baño maría (100 °C) durante 5 minutos. El sobrenadante se traspasó a otro tubo y al material que quedó, se le volvió a agregar alcohol 85 ° y a calentar en baño María. Se repitieron estos pasos dos veces más y se filtró el sobrenadante resultante con embudo y papel de filtro. Así es como se obtuvo el extracto, el cual se diluyó hasta completar 20 ml y se tomaron

5 ml para determinar azúcares totales y otros 5 ml para azúcares reductores. A cada una de estas diluciones se les agregó 2 ml de agua bidestilada y se las calentó a baño María (100°C) durante 5 minutos para extraerles el alcohol. Luego, a las muestras para determinar azúcares totales se les agregó 1 ml de HCl 0,1 M y se calentaron en baño María por 5 minutos, con el objetivo de que se produzca una hidrólisis ácida y así transformar los disacáridos en monosacáridos. Este paso sólo se realizó para determinar azúcares totales. Seguidamente, a cada muestra se les agregó 2 ml de reactivo cúprico y se llevaron a baño caliente durante 10 minutos. Se dejaron enfriar y se les agregó 1 ml del segundo reactivo. Se enrasaron a 25 ml con agua bidestilada y se agitaron. A partir de estas muestras, se tomó 1 ml de cada repetición y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 520 nm.

- Contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Singleton & Rossi, (1965), con modificaciones.

Se determinó por el método colorimétrico que emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se homogeneizaron 500 mg de tejido foliar fresco en etanol. La mezcla se agitó y se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C. Se tomó una alícuota de la muestra y se mezcló con agua destilada y el reactivo de Folin 1 N. Luego de 3 min a 25 °C se agregó la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 % (p/v) en NaOH 0,1 N. Se incubó durante 90 minutos a 25 °C y se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro. Se realizó una curva patrón en base a distintas concentraciones de ácido gálico. Las lecturas de absorbancia se efectuaron a 760 nm y los resultados finales se expresaron como µg. mg<sup>-1</sup> de tejido fresco.

- Determinación de MDA mediante el método de Heath & Packer (1968).

La cantidad de MDA en tejidos fresco, se determinó mediante la reacción con el ácido thiobarbitúrico (TBA) descrita por Heath & Packer (1968). Se molieron 200 mg de tejido fresco, se agregaron 5 ml de TBA 0,5% en 20% de ácido tricloroacético (TCA). La mezcla se calentó a 95°C durante 30 minutos y luego se enfrió rápidamente en un baño frío. Se centrifugó a 10000 g por 10 minutos, se separó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 532 y 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 UV/V. La concentración de MDA se calculó usando un coeficiente de extinción molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>:

Equivalentes de MDA (n.mol.ml<sup>-1</sup>) = [(A532 - A600) / 155000] 106

- Determinación de la conductividad relativa de las membranas celulares de hojas y raíces.

La determinación de la conductividad relativa de las membranas celulares de hojas y raíces se realizó a partir de 200 mg de material fresco de hojas y de raíces, según el método de Lutts *et al.* (1996). Inmediatamente después del muestreo, los tejidos se lavaron tres veces con agua bidestilada durante 15 segundos, para eliminar los electrolitos adheridos a la superficie y aquellos liberados por las heridas producidas por el corte. Posteriormente, cada muestra se sumergió en un tubo con 10 ml de agua bidestilada donde permanecieron durante cuatro horas a temperatura ambiente. Seguido a esto, se determinó la conductividad eléctrica ( $\text{dS m}^{-1}$ ) empleando un conductímetro Jenco modelo 3173. Luego, los tubos se taparon y se llevaron a autoclave donde se mantuvieron por 20 minutos a una presión de una atmósfera y  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con el objetivo de afectar totalmente la integridad de las membranas. Finalmente, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió nuevamente la conductividad eléctrica del medio. En base a los datos obtenidos, se estimó la conductividad relativa de las membranas celulares a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{CR (\%)} = (L_1/L_2) \times 100$$

Donde,  $L_1$  y  $L_2$  son las lecturas de conductividad eléctrica antes y después del autoclavado respectivamente.

- Determinación de enzimas peroxidasas por el método de Maehly & Chance (1954).

Para medir la actividad de peroxidasas inespecíficas se homogeneizaron 250 mg de hoja en 1 ml de solución buffer de 50 mM de fosfato de potasio (pH 7), 10 mM de EDTA disódico y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) para remover interferencias de compuestos fenólicos a  $4^{\circ}\text{C}$  (Loomis, 1969). Los homogenatos se centrifugan a 15000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . La actividad de la enzima se determinó por el aumento de la absorbancia a 470 nm debido a la formación de guayacol (coeficiente de extinción  $26,6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ). La actividad se expresó como  $\mu\text{mol guayacol. g}^{-1}\text{ PF. min}^{-1}$ .

- Determinación de enzimas catalasas por el método de Aebi (1984).

Se realizó por el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984), basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm debida a la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por efecto de la catalasa. En una cubeta de cuarzo se añaden la muestra, preparada de igual forma que se describió para las enzimas peroxidasas, y la mezcla de reacción, protegida de la luz y formada por buffer fosfato K 50 mM pH 7 y  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 mM hasta completar un volumen final de 1 ml en la cubeta. La reacción se registró durante 30 segundos con intervalos de 5 segundos a  $25^{\circ}\text{C}$  en un espectrofotómetro, frente a un blanco que fue la solución buffer. Se midió la cantidad de peróxido

descompuesto y la actividad se expresó en  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumidos por minutos sobre  $\text{mg}$  de proteínas y se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción y de un coeficiente de extinción molar para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### Diseño experimental

El ensayo se realizó siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado, con diez repeticiones. Los datos se analizaron por ANOVA y las medias se compararon usando LSD ( $P < 0,05$ ) utilizando el programa estadístico Infostat 2018. Tanto para este capítulo como los siguientes los cuadros estadísticos de ANOVA se encuentran en el ANEXO.

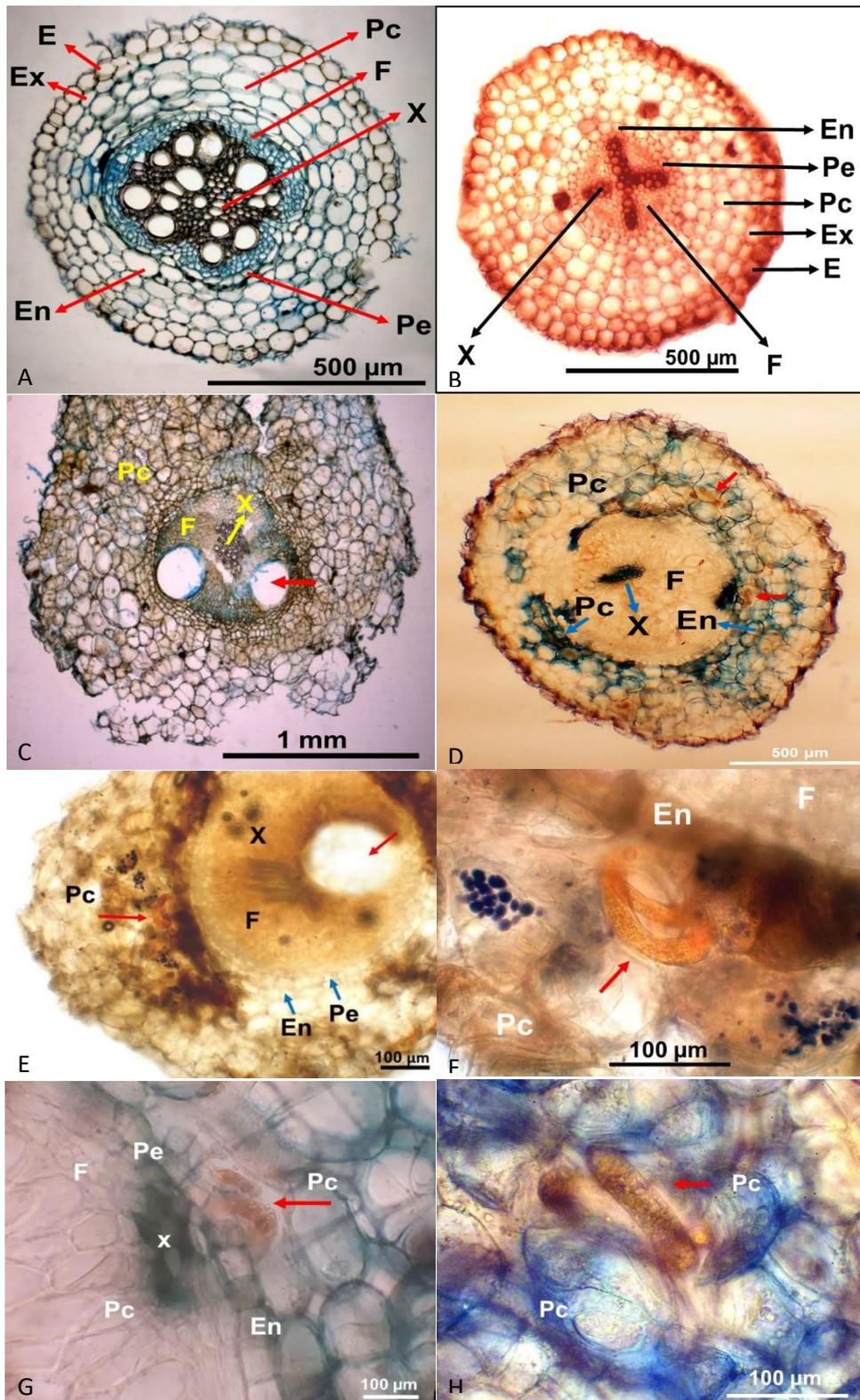
## 2.4- RESULTADOS

Después del trasplante se inocularon 8000 huevos del nematodo por maceta y al finalizar se contabilizaron 154750 huevos, demostrando que se produjo una efectiva inoculación, que las condiciones del ensayo fueron favorables para su multiplicación y que el pimiento es una especie susceptible a esta plaga según el factor de reproducción de Oostenbrink ( $\text{Fr} = \text{Pf} \cdot \text{Pi}^{-1}$ ) donde  $\text{Fr} > 1$  indica susceptibilidad al nematodo, al comparar la población final con la población inicial.



**Imagen 2.2:** Raíces de pimiento inoculados y no inoculados con *N. aberrans*. A: Agallas. H: Huevos y juveniles (J) de *N. aberrans* (Imagen propia).

El análisis histológico de las raíces de las plantas sin inocular mostró un desarrollo anatómico normal, con una estructura ordenada de los tejidos. Las raíces normales son tetrarcas (Imagen 2.3 A y B), en cambio, las raíces agalladas presentaron nematodos en el parénquima cortical y destrucción y/o deformación del tejido floemático, observándose huecos ocupados por las hembras maduras (sincito). Se observó hiperplasia e hipertrofia del parénquima asociado al tejido vascular quedando reducido el xilema secundario (Imagen 2.3 C y D). En las áreas donde ingresaron y se localizaron los nematodos se observó la acumulación de gránulos de almidón, los cuales caracterizan los sectores de la raíz dañados por la acción mecánica de *N. aberrans* (Imagen 2.3 E y F). En este estudio se encontraron también nematodos alojados en el periciclo y en el parénquima cortical (Imagen 2.3 G y H).



**Imagen 2.3:** A-H. Corte transversal de raíz control (A-B) y de raíz con deformaciones por la presencia de agallas (C-H) y su patrón tisular. Nótese la presencia de nematodos en asociación a células corticales con granos de almidón. E: epidermis, Ex: exodermis, Pc: parénquima cortical,

En: endodermis, Pe: periciclo, F: floema, X: xilema, Flecha roja: Presencia de nematodos (Imagen propia).

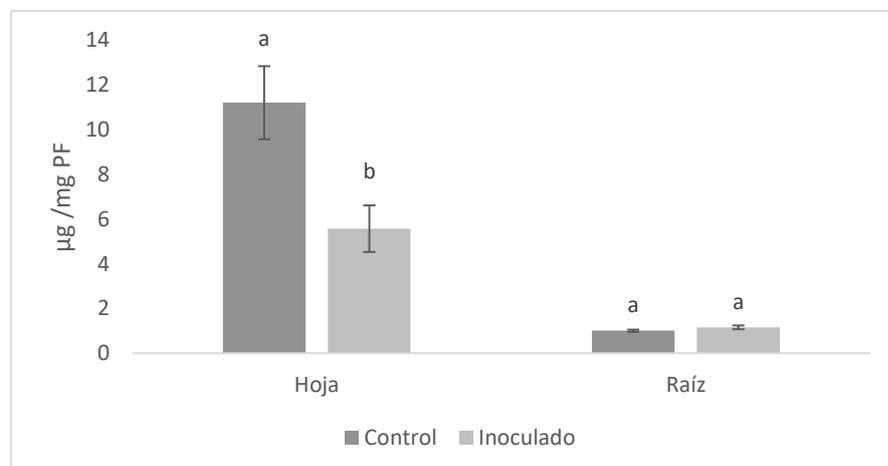
Mientras que la aplicación de huevos de nematodos a las macetas no generaron diferencias en las dimensiones de los tallos de las plántulas, el peso seco aéreo y de raíz se redujo un 20 y 22 % respectivamente (Tabla 2.1) así como también el contenido de clorofila (49 %) con respecto a las plantas sin inocular (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1:** Altura, diámetro, peso seco aéreo y de raíz, y clorofila de plantas de pimiento no inoculadas (control) o inoculadas con *Nacobbus aberrans* (inoculado).

<i>N. aberrans</i>	Altura (cm)	Diámetro (cm)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco de raíz (g)	Clorofila ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Control	41 a	1,01 a	27 a	22,80 a	60,42 a
Inoculado	46,43 a	1,10 a	21,83 b	17,40 b	29,85 b

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Similar patrón se observó con el contenido de proteínas solubles, que fue mayor en hojas que en raíces. En hojas fue significativamente mayor en las plantas control, 5,601  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de PF, respecto a las inoculadas con el nematodo 2,785  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de PF ( $p < 0,05$ ). En las raíces, el contenido de proteínas no se modificó significativamente (Figura 2.1).



**Figura 2.1:** Contenido de proteínas solubles de plantas de pimiento no inoculadas (control) o inoculadas con *Nacobbus aberrans* (inoculado). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La fotosíntesis neta disminuyó significativamente al igual que la transpiración lo que llevó a una menor eficiencia en el uso del agua en las plantas inoculadas con *N. aberrans* comparadas con el control sin inocular. La conductancia estomática en las plantas inoculadas también fue significativamente menor en comparación con las plantas control (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2:** Fotosíntesis neta (PN), transpiración (E), conductancia estomática (G) y eficiencia en el uso de agua (EUA) de plantas de pimiento no inoculadas (control) o inoculadas con *Nacobbus aberrans* (inoculado).

<i>N. aberrans</i>	PN ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	E ( $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	G ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	EUA ( $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ )
Control	13,77 a	2,47 a	59,83 a	6,5 a
Inoculado	4,43 b	0,94 b	13,95 b	4,4 b

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los valores de contenido de prolina presentaron diferencias significativas tanto en hojas como en raíz. En hojas el contenido de prolina aumentó significativamente en las plantas expuestas al nematodo, en raíz el comportamiento fue inverso (Tabla 2.3). El contenido de azúcares totales y azúcares reductores fue significativamente mayor en las hojas que en las raíces. En las hojas, el contenido de azúcares totales y reductores fue significativamente mayor en las plantas infectadas con *N. aberrans*. En cambio, en las raíces no hubo diferencias significativas en los resultados (Tabla 2.3). El contenido de compuestos fenólicos, tanto en hojas como en raíces, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, aunque se pudo observar cierta tendencia al aumento en las plantas infectadas por el nematodo, siendo su contenido en hojas 18% y en raíz 10,5% mayor (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3:** Contenido de prolina (P), azúcares totales (A T), azúcares reductores (A R) y compuestos fenólicos (C F) de plantas de pimiento no inoculadas (control) o inoculadas con *Nacobbus aberrans* (inoculado).

<i>N. aberrans</i>	P		A T		A R		C F	
	(μmoles. g <sup>-1</sup> PF)		(mg.g <sup>-1</sup> PF)		(mg.g <sup>-1</sup> PF)		(μg. mg <sup>-1</sup> PF)	
	Hojas	Raíz	Hojas	Raíz	Hojas	Raíz	Hojas	Raíz
Control	3,53 b	4,29 a	495,69 b	108,07 a	419,62 b	77,67 a	2,17 a	0,34 a
Inoculado	6,61 a	3,46 b	830,06 a	154,17 a	557,43 a	43,12 a	2,64 a	0,38 a

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

El contenido de malondialdehído (MDA) fue significativamente más alto en las hojas que en las raíces. En las hojas, los valores más altos se observaron en las plantas inoculadas con el nematodo (7,28 nm MDA g<sup>-1</sup>) respecto de las plantas control (5,66 nm MDA g<sup>-1</sup>). Lo mismo sucedió en las raíces, donde las plantas inoculadas presentaron mayor contenido de MDA que las plantas no inoculadas, con diferencias significativas (Tabla 2.4). La actividad de la enzima catalasa fue mayor en raíces que en hojas. En ambos casos se observó un aumento significativo de la actividad de la enzima en las plantas infectadas por *N. aberrans* comparadas con el tratamiento control (Tabla 2.4). En cuanto a la actividad de las enzimas peroxidasa, también fue mayor en raíces que en hojas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en hojas ni en raíces, en las plantas infectadas por el nematodo, pero aun así se registró mayor actividad de esta enzima en estas plantas (Tabla 2.4). Con respecto al daño de las membranas celulares medido a través de la conductividad eléctrica, se determinó que en hojas la conductividad relativa aumentó significativamente (46,88%) con respecto a las plantas no inoculadas (26,62%). En las raíces también se pudo observar daño en las membranas, siendo mayor el valor en las plantas inoculadas con el nematodo (p < 0,05) (Tabla 2.4).

**Tabla 2.4:** Contenido de malonilaldehído (MDA), catalasas totales (CAT), peroxidasa totales (POX) y conductividad relativa de membranas (CR) de plantas de pimiento no inoculadas (control) o inoculadas con *Nacobbus aberrans* (inoculado).

<i>N. aberrans</i>	MDA		CAT		POX		CR	
	(nm MDA.g <sup>-1</sup> )		(UA.mg <sup>-1</sup> prot)		(UA.mg <sup>-1</sup> prot)		(% )	
	Hojas	Raíz	Hojas	Raíz	Hojas	Raíz	Hojas	Raíz
Control	5,66 b	0,19 b	0,010 b	0,018 b	0,23 a	1,52 a	26,62 b	12,51 b
Inoculado	7,28 a	1,79 a	0,017 a	0,027 a	0,44 a	1,69 a	46,28 a	20,54 a

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

## 2.5- DISCUSIÓN

Las plantas expuestas a *N. aberrans* manifiestan marchitez, disminución del crecimiento, pérdidas del rendimiento e incluso la muerte de la planta (Cristobal et al., 2001). En el presente trabajo, se analizó el impacto de la infección de *Nacobbus aberrans* sobre plantas de pimiento creciendo en condiciones experimentales. En las raíces el daño producido por el nematodo se debe tanto a la acción mecánica como enzimática provocada por su ingreso a la raíz, y en los tejidos aéreos los daños están relacionados a los procesos de deshidratación sufridos por la planta como consecuencia de la alteración de los tejidos radicales por el parasitismo por el nematodo. Este tipo de nematodos posee glándulas esofágicas que segregan enzimas xilanasas y poligalacturonasas que inducen reprogramación génica de las células de la raíz para formar los sitios de alimentación (sincitos) donde se alojaran las hembras maduras. Los sincitos se caracterizan por tener citoplasma denso, núcleo grande y paredes gruesas (Perry & Moens, 2011; Palomares-Rius et al., 2018). Como consecuencia de esto, se pierde la conexión entre floema y xilema provocando la desorganización y reducción del sistema vascular (Jones et al., 2013). En este estudio, se observó la formación de sincitos en el cilindro vascular, desplazando al floema y al xilema. El parénquima cortical proliferó y sus células acumularon almidón, un aspecto típico de la infección por *N. aberrans* (Lorenzo et al., 2001). Condiciones similares reportaron Chavarro- Carrero et al. (2017) donde si bien no observaron formación de sincitos si había presencia de juveniles de estadio 3 y 4 de *N. aberrans* en el periciclo y la acumulación de gránulos de almidón en las raíces de pimiento. Similares resultados fueron obtenidos en tomate, remolacha y papa, donde hembras de *N. aberrans* formaron sincitos en el cilindro central, que estuvo a la vez asociado a hipertrofia e hiperplasia de las células del tejido vascular (Tovar Soto et al., 2012; Cabrera et al., 2016; Tordable et al., 2018). Como consecuencia de la infección las plantas expuestas al nematodo sufren déficit hídrico

(Hewezi & Baum, 2013). Esta baja absorción de agua y nutrientes en hospedantes susceptibles provoca una reducción en el crecimiento apical lo que resulta también en un severo achaparramiento de las plantas, clorosis y enrollamiento de las hojas (Jatala, 1985). En este trabajo, algunos parámetros estudiados como la altura y el calibre del tallo no se vieron afectados por la presencia del nematodo en las raíces, coincidiendo con Chaves *et al.* (2011), que observaron que en genotipos de tomate clasificados como altamente susceptibles el fitoparásito no afectó la altura. Luego de varias generaciones la población alcanza niveles mayores y el daño comienza a repercutir en el crecimiento (Manzanilla Lopez *et al.*, 2002). No obstante ello, la respuesta también es dependiente de la carga poblacional en el suelo, la susceptibilidad del cultivo hospedante y las condiciones ambientales. Chaves *et al.* (2011) indicaron que la severidad de la enfermedad sobre los genotipos que se clasificaron como susceptibles y altamente susceptibles de plantas de tomate, disminuyó los pesos frescos de tallo y de raíz, coincidiendo con nuestros resultados donde tanto el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la raíz fueron menores en las plantas inoculadas con el nematodo. Esto se debe a que el agallamiento causado por el nematodo en las raíces, altera la absorción de agua y nutrientes y afecta de manera negativa el crecimiento de las plantas, así como la acumulación de biomasa (Cristobal *et al.*, 2001).

El contenido de clorofila y proteínas solubles en hojas disminuyeron en las plantas infectadas por *N. aberrans*. Al-Yahya *et al.* (1998) demostraron también una reducción en el contenido de clorofila en trigo infestado por el nematodo *Heterodera avenae*. Igualmente, se observó en tomate infestado con *Meloidogyne sp.* acompañado de una reducción en el estado nutricional (Nayak & Moharty, 2010) y en plantas de calabaza infectadas con *Meloidogyne incognita* (Mahaprata & Nayak, 2019). En nuestro trabajo el contenido de proteínas en las raíces fue levemente superior en las plantas infectadas por el fitoparásito. Esto podría deberse a la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis. Estas proteínas también llamadas proteínas PR, son un grupo variable que se acumulan en las plantas durante y después de la infección con patógenos (Madriz Ordeñanaz, 2002).

La fotosíntesis y la transpiración de las hojas son procesos fundamentales para el crecimiento y la producción vegetal. Estos procesos están directamente relacionados con la conductancia estomática. Una reducción en esta última representa una respuesta rápida de la planta para evitar la pérdida de agua mediante el proceso de transpiración (Cristóbal *et al.*, 2001). Esta respuesta se vio reflejada en las plantas infestadas por el nematodo, siendo la conductancia significativamente menor que en las plantas sin infección. Lo mismo sucedió con la fotosíntesis neta y la transpiración. En plantas de

pimiento inoculadas con *M. incognita* la fotosíntesis y la conductancia estomática se vieron severamente afectadas por la inoculación en comparación con plantas no inoculadas y plantas inoculadas e injertadas (Strajnar *et al.*, 2012). Después de la inoculación en plantas de pimiento susceptible con *M. incognita*, la fotosíntesis se vio afectada por la regulación estomática alterada y la eficiencia fotoquímica, en comparación con plantas de pimiento injertadas, con un portainjerto resistente a *Meloidogyne sp.* (Galvez *et al.*, 2019). La reducción de la tasa transpiratoria se ha verificado en diferentes cultivos (tomate, papa, menta) solamente con los fitonematodos que ocasionan alteraciones en las células de las raíces como *Meloidogyne sp.* y *Globodera sp.* (Gúzman Piedrahíta, 2020).

Las condiciones derivadas de la infección por nematodos ocasionan un incremento sistémico de sustancias asociadas que, como tales, pueden resultar útiles como “indicadores” del estrés hídrico (Moreno & Patricia, 2009). Como consecuencia del estrés hídrico se produce la acumulación de solutos tales como glicerol, azúcares, betaínas y prolina a fin de mantener la turgencia celular por ajuste osmótico (Wahid *et al.*, 2007; Nagesh & Devaraj, 2008). En este trabajo tanto el contenido de prolina como el contenido de azúcares totales y reductores fue mayor en las plantas inoculadas con *N. aberrans* a diferencia de los controles sin infección por el nematodo, coincidiendo con Garita *et al.* (2018) quienes observaron que plantas de tomate injertadas y sin injertar, en presencia de *N. aberrans*, presentaron contenidos de prolina más altos. Resultados similares obtuvieron Mahapatra & Nayak (2019) en calabaza donde las plantas que fueron inoculadas con *M. incognita* tuvieron mayor acumulación de prolina y azúcares totales en brotes y raíces. Por otro lado, un incremento en el contenido de compuestos fenólicos se asocia con resistencia a nematodos migratorios y sedentarios (Arias *et al.*, 2009). Estos compuestos se suelen acumular en las zonas de infección mientras que en los órganos de la planta no afectados por la infección puede acumularse mucho más (Incremento sistémico) ya que son capaces de migrar a través de los tejidos (Arias *et al.*, 2009). En el presente ensayo el contenido de compuestos fenólicos aumentó tanto en hojas como en raíces, aunque sin diferencias significativas entre tratamientos. En variedades de tomates resistentes y susceptibles inoculados con *Meloidogyne javanica* se registró un aumento del contenido de compuestos fenólicos totales en raíces en comparación con las plantas no inoculadas (Banora & Almaghrabi, 2019). En plantas de tomate inoculadas con *Meloidogyne sp.* el elevado contenido de compuestos fenólicos sintetizados en la planta y traslocados hacia las raíces, confieren resistencia a la infección del nematodo (Arias *et al.*, 2009). Todo esto sugiere que la infección de las

raíces de pimiento por *N. aberrans* activa mecanismos de defensa que conduce a la acumulación de compuestos fenólicos.

El estrés que produce el nematodo sobre las plantas afecta también su normal crecimiento debido a la dificultad para absorber agua y nutrientes. A nivel celular, este estrés provoca la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares acelerando la senescencia vegetal y conduciendo a la muerte celular (Göbel *et al.*, 2003). En este trabajo, la penetración de formas móviles de *N. aberrans* junto con la formación de agallas inducidas por las hembras en las raíces produjeron alteraciones en las membranas de sus células, evidenciado por diferentes marcadores de estrés oxidativo como el incremento en el contenido de MDA. Este es un subproducto de la peroxidación de los lípidos en las membranas y su concentración puede ser de utilidad como marcador del tipo de estrés al que las plantas están expuestas (Arbona *et al.*, 2003). En nuestros resultados, el contenido de MDA aumentó en hojas y raíces de las plantas inoculadas con *N. aberrans*, coincidiendo con El-Betagui *et al.* (2012) quienes observaron que en plantas de tomate inoculadas con *M. incognita* hubo un aumento en la acumulación de MDA, tanto en hojas como en raíces. Ruscitti *et al.* (2015) observaron en plantas de tomate que el contenido de MDA varió entre 1,4 y 2,4 nmoles.g<sup>-1</sup> PF en plantas mantenidas a capacidad de campo y plantas bajo estrés hídrico respectivamente. Por otro lado, una de las respuestas de defensa más rápidas que ocurren a continuación del reconocimiento del nematodo es la llamada explosión oxidativa, la cual consta de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en el sitio de invasión del nematodo (Arias *et al.*, 2009). La actividad catalasa fue significativamente mayor en plantas parasitadas por *N. aberrans*, tanto en hojas como en raíz. En hojas fue mayor la actividad que en las raíces, esta respuesta puede deberse a que la actividad catalasa es inducida tanto localmente como sistémicamente (Arias *et al.*, 2009). Resultados similares ocurrieron en plantas de tomate inoculadas con *M. incognita* donde la actividad enzimática, particularmente la actividad catalasa y peroxidasa, en brotes y raíces fue mayor en plantas inoculadas (El-Betagi *et al.*, 2012). Una respuesta similar fue observada en plantas de *Vitis vinifera* infestadas con *M. incognita* y *Rotylenchus reniformis* donde también observaron un aumento de MDA, similarmente a lo observado en este trabajo (Kesba & El-Bategui, 2012). La actividad de las enzimas peroxidadasas se incrementa con la infección del patógeno a fin de evitar la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la generación de un ambiente celular tóxico. No obstante, estas respuestas pueden estar también asociadas a la lignificación del tejido, siendo uno de los mecanismos de defensa indicados a nivel del tallo (Barros-ríos *et al.*, 2011). En este trabajo, la actividad de las enzimas peroxidadasas totales, si bien no mostraron diferencias

significativas entre tratamientos, fue mayor en las plantas inoculadas con *N. aberrans*. Anjum *et al.* (2012), observaron que en plantas de pimiento sometidas a estrés hídrico, las actividades catalasa y peroxidasa total fueron mayores en las plantas sometidas a períodos prolongados de sequía en los primeros 12 días, luego la actividad fue disminuyendo comparado con las plantas control. A su vez, en raíces de tomate infestadas con nematodos formadores de agallas, se observó también la activación local de genes de defensa que codifican enzimas como peroxidasa, quitinasas, lipoxigenasa, e inhibidores de proteinasas, dentro de las 12 horas posteriores a la inoculación (Lambert, 1995). En cultivares de tomate resistentes y susceptibles inoculados con *M. javanica*, con *Fusarium oxysporum* y con ambos microorganismos, la actividad peroxidasa, catalasa y el contenido de compuestos fenólicos y azúcares totales fue mayor en las plantas inoculadas (Lobna *et al.*, 2016).

Es conocido que la infección del nematodo puede afectar la integridad de las membranas celulares en los tejidos vegetales afectados, lo que desencadena la liberación de electrolitos. La conductividad relativa de las membranas celulares y en consecuencia el daño producido, fue significativamente más alto en las plantas infectadas por nematodos, tanto en hojas como en raíces. Esta alteración de la permeabilidad selectiva de las membranas celulares del hospedante puede estar asociada al ciclo de vida del nematodo donde los juveniles del segundo estadio ingresan y egresan repetidamente de las raíces provocando heridas. También no se puede descartar que esta respuesta esté relacionada con la formación de las agallas y por el incremento de las hembras maduras que alteran la integridad de las células y reducen y obstruyen los sistemas de conducción (Doucet & Lax, 2005). Anjum *et al.* (2012) observaron que en plantas de pimiento, a medida que se extiende el período de sequía, la peroxidación de lípidos y la liberación de electrolitos a través de las membranas vegetales son mayores en plantas infectadas que en plantas control.

Para concluir, se pudo observar que los daños provocados por *N. aberrans* afectan a la planta a nivel fisiológico y morfológico. No sólo la acción mecánica del nematodo produce daños a las células de la raíz sino también el déficit hídrico que provoca en las plantas al impedir la normal absorción de agua y nutrientes, lo que lleva a alteraciones en las funciones de las plantas.

## **2.6- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.**

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.

- Al-Yahya, F. A., Alderfasi, A. A., Al-Hazmi, A. S., Ibrahim, A. A. M., & Abdul-Razig, A. T. (1998). Effects of cereal cyst nematode on growth and physiological aspects wheat under field conditions. *Pakistan Journal of Nematology*, 16, 55-62.
- Anjum, S. A., Farooq, M., Xie, X. Y., Liu, X. J., & Ijaz, M. F. (2012). Antioxidant defense system and proline accumulation enables hot pepper to perform better under drought. *Scientia Horticulturae*, 140, 66-73.
- Arbona, V., Flors, V., Jacas, J., García- Agustín, P., & Gómez- Cadenas, A. (2003). Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock to different levels of salinity. *Plant and Cell Physiology*, 44: 388-394.
- 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 de Protección Vegetal*, 24(1), 1-13.
- Banora, M. Y., & Almaghrabi, O.A.A. (2019). Differential response of some nematode-resistant and susceptible tomato genotypes to *Meloidogyne javanica* infection. *Journal of Plant Protection Research*, 113-123.
- Barros-Ríos, J., Malvar, R. A., & Santiago, R. (2011). Función de la pared celular del maíz (*Zea mays* L.) como mecanismo de defensa frente a la plaga del taladro (*Ostrinia nubilalis* Hüb. y *Sesamia nonagrioides* Lef.). *Revista de Educación Bioquímica*, 30(4), 132-142.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Tease, I. D. (1973). Rapid determination of the proline for stress studies. *Plant Soil*, 85: 107-129.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cabrera, V. A., Dottori, N., & Doucet, M. E. (2017). Histopathology of roots of three tomato cultivars infected with two separate isolates of the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology*, 148(2), 393-403.
- Castillo, P. G., & Marbán-Mendoza, N. (1984). Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne & Allen 1944 en raíces de *Capsicum annuum* y *C. baccatum*. *Agrociencia*, 56: 85-93.
- Chavarro-Carrero, E. A., Valdovinos-Ponce, G., Gómez-Rodríguez, O., Nava-Díaz, C., Aguilar-Rincón, V. H., & Valadez-Moctezuma, E. (2017). Respuesta de la línea 35-3 de

chile tipo huacle (*Capsicum annuum*) a dos poblaciones de *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*, 47(1), 74-85.

Chaves, C. G., Marcillo, E. M., Gonzalez, C. S., & Garcia, C. B. (2011). Susceptibilidad de genotipos de *Solanum spp.* al nematodo causante del nudo radical *Meloidogyne spp.*(chitwood). *Acta agronómica*, 60(1), 50-67.

Coolen, W. A. (1979). Methods for the extraction of *Meloidogyne spp.* and other nematodes from roots and soil. Pp. 317-330 in F. Lamberti and C.E. Taylor, eds. Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species) Systematics, Biology and Control. Academic Press, New York, NY, U.S.A.

Cristóbal, A. J., Herrera-Parra, E., Reyes Oregel, V., Ruiz Sánchez, E., Tun Suárez, J. M., & Celis Rodríguez, T. (2010). *Glomus intraradices* para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood en condiciones protegidas. *Fitosanidad*, 14(1), 25–29.

Cronin, D., & Smith, S. (1979). A simple and rapid procedure for the analysis of reducing, total and individual sugars in potato. *Potato Research*, 22: 99-105.

Doucet, M. E., & Lax, P. (2005). El Género *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 en la Argentina. 6. La especie *N. aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Tylenchida) y su relación con la agricultura. (Tomo LIX, pp. 5–14). Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria.

El-Beltagi, H. S., Farahat, A. A., Alsayed, A. A., & Mahfoud, N. M. (2012). Response of antioxidant substances and enzymes activities as a defense mechanism against root-knot nematode infection. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1), 132-142.

Eves-van den Akker, S., Lilley, C. J., Danchin, E. G. J., Rancurel, C., & Cock, P. J. A. (2014). The Transcriptome of *Nacobbus aberrans* reveals Insights into the Evolution of Sedentary Endoparasitism in Plant-Parasitic Nematodes. *Genome Biology and Evolution*, 6(9), 2181-2194.

Gálvez, A., del Amor, F. M., Ros, C., & López-Marín, J. (2019). New traits to identify physiological responses induced by different rootstocks after root-knot nematode inoculation (*Meloidogyne incognita*) in sweet pepper. *Journal of Crop Protection*, 119, 126-133.

- Garita, A. S., de Almeida Guimaraes, M., Arango, M. C., de Jesus Tello, J. P., & Ruscitti, M. (2018). Performance of tomato rootstocks in False Root-knot Nematode (*Nacobbus aberrans*) infested soil. *Australian Journal of Crop Science*, 12(11), 1725.
- Göbel, C., Feussner, I., & Rosahl, S. (2003). Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 52834–52840.
- Gurr, E. (1971). *Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry*. 1st. edition. Academic Press, London, 814 p.
- Guzmán-Piedrahita, Ó. A., Zamorano-Montañez, C., & López-Nicora, H. D. (2020). Interacciones fisiológicas de plantas con nematodos fitoparásitos: una revisión. *Boletín Científico. Centro de Museos*, 24(2), 190-205.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
- Hewezi, T., & Baum, T. J. (2013). Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(1), 9-16.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station, 347(2nd edit).
- Hussey, R. S., & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.*, including a new technique. *Plant Disease Report*, v. 57, p. 1025-1028.
- Inserra, R. N., Griffin, G. D., & Anderson, J. L. (1985). The false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. Utah agricultural experiment station research bulletin, (510).
- Jatala, P. (1985). Biological control of nematodes. An advanced treatise on *Meloidogyne*. *Biology and control*, (1)303-308.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946-961.
- Kesba, H. H., & El-Beltagi, H. S. (2012). Biochemical changes in grape rootstocks resulted from humic acid treatments in relation to nematode infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(4), 287-293.

- Lambert, K. N. (1995). Isolation of Genes Induced Early in the Resistance Response to *Meloidogyne javanica* in *Lycopersicon esculentum*. PhD Dissertation (Davis: University of California-Davis).
- Lobna, H., Hajer, R., Naima, M. B., & Najet, H. R. (2016). Studies on disease complex incidence of *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on resistant and susceptible tomato cultivars. *J Agr Sci Food Technol*, 2:41–48
- Lorenzo, E., Doucet, M. E., Tordable, M. C., & Poloni, N. (2001). Anatomía de raíces de pimiento y tomate atacadas por *Nacobbus aberrans*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 36, 97–103.
- Lutts, S., Kinet, J. M., & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78(3), 389-398.
- Madriz Ordeñana, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas (CATIE)*, (63)22-32.
- Maehly, A., & Chance, B. (1954). Catalases and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis*, 1, 357-424.
- Mahapatra, M., & Nayak, D. K. (2019). Biochemical and physiochemical changes in susceptible and resistant bitter melon cultivars/varieties as influenced by root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7, 80-87.
- Manzanilla-López, R. H., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R. N., Lehman, P. S., Cid del Prado-Vera, I., Souza, R. M., & Evans, K. (2002). The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica*, 32:149-227.
- Moreno, F., & Patricia, L. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía colombiana*, 27(2), 179-191.
- Nagesh Babu, R., & Devaraj, V. R. (2008). High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Australian Journal of Crop Science*, 2(2), 40-48.
- Nayak, P. (2009). The Expression of Ependymin in *C. elegans* Roundworms-II (Doctoral dissertation, Worcester Polytechnic Institute).
- Nayak, D. K., & Mohanty, K. C. (2010). Biochemical changes in brinjal induced by root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Indian Journal of Nematology*, 40(1), 43.

Oostenbrink, M. (1966). Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Major characteristics of the relation between nematodes and plants*, (66-4).

Palomares-Rius, J. E., Cantalapiedra-Navarrete, C., Archidona-Yuste, A., Tzortzakakis, E. A., Birmpilis, I. G., Vovlas, N., & Castillo, P. (2018). Prevalence and molecular diversity of reniform nematodes of the genus *Rotylenchulus* (Nematoda: Rotylenchulinae) in the Mediterranean Basin. *European Journal of Plant Pathology*, 150(2), 439-455.

Perry, R. N., & Moens, M. (2011). Introduction to Plant-Parasitic Nematodes; Modes of Parasitism. In: Jones J., Gheysen G., Fenoll C. (eds) *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer, Dordrecht.

Ruscitti, M., Garita, S., Arango, M. C., & Beltrano, J. (2015). Inoculación con aislamientos seleccionados de hongos vesículo-arbusculares como alternativa para moderar el estrés hídrico en plantas de tomate platense bajo condiciones de invernáculo. *Revista Facultad de Agronomía*, 114(2), 219–229.

Schuster, M. L., Sandstedt, R., & Estes, W. (1965). Host-parasite relations of *Nacobbus batatiformis* and the sugar beet and other hosts. *Journal of the American Society of Sugar Beet Technology*, 6, 523-537.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

Strajnar, P., Širca, S., Urek, G., Šircelj, H., Železnik, P., & Vodnik, D. (2012). Effect of *Meloidogyne ethiopica* parasitism on water management and physiological stress in tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 132(1), 49-57.

Tordable, M. D. C., Andrade, A. J., Doucet, M. E., & Lax, P. (2018). Histopatología de variedades de batata andina (*Solanum tuberosum* grupo Andigenum) parasitadas pelo falso nematóide das galhas, *Nacobbus aberrans*. *Brazilian Journal of Biology*, 78(4), 679-685.

Tovar-Soto, A., Medina-Canales, M. G., & Torres-Coronel, R. (2012). Distribución, incidencia y alteraciones histológicas de una nueva enfermedad en betabel (*Beta vulgaris* L.) causada por el falso agallador *Nacobbus aberrans*, en el Valle de Tepeaca, Puebla, Mexico. *Nematropica*, 191-197.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199-223.

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls A and B, as well as Total caroteinds, using various solvents with Spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307-313.

Zarlavsky, G. (2014). *Histología vegetal: Técnicas simples y complejas*. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires.

### **Capítulo 3**

## **Hongos formadores de micorrizas arbúsculares como potenciales antagonistas de *Nacobbus aberrans*.**

### 3.1- INTRODUCCIÓN

Como se vió en el capítulo anterior, el daño provocado por *N. aberrans* en las plantas de pimiento altera los procesos fisiológicos y bioquímicos así como las funciones hídricas, nutricionales y de transporte de fotoasimilados. Es por ello que en este capítulo se mostrarán los efectos que producen tres cepas de micorrizas arbusculares sobre la población de *N. aberrans* y a las plantas, ya sea por acción directa como antagonista del nematodo o indirecta como bioprotectoras de las plantas, lo que las hace factible para ser estudiada. Se mencionó anteriormente que las micorrizas arbusculares pueden conferir tolerancia a patógenos y plagas a través de diferentes mecanismos de acción (Schouteden *et al.*, 2015). Uno de los mecanismos más importante está relacionado con la actuación de las hifas extraradiculares como complemento de la raíz en la absorción de agua y nutrientes debido a un aumento del volumen de suelo explorado lo que provoca una mayor tasa de absorción por unidad de superficie (Azcon- Aguilar & Barea, 1997). También actúan en la competencia por espacio o nutrientes evitando, en el caso de los nematodos, que puedan ingresar a la raíz o alimentarse de ella. Otro mecanismo importante es la inducción de resistencia en las plantas activando señales de defensa contra patógenos. Otros mecanismos incluyen micoparasitismo, lisis enzimática, antibiosis, y producción de exudados (Baum *et al.*, 2015). La información sobre el efecto de la interacción entre *N. aberrans*, las micorrizas y los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas es muy escasa. La mayoría de las investigaciones evaluaron la interacción de los hongos AM con el nematodo agallador *Meloidogyne sp. o Pratylenchus sp.* pero no con *N. aberrans* (Bañuelos *et al.*, 2012; Frew *et al.*, 2018; Korayem *et al.*, 2012; Sharma & Sharma, 2017). Los mecanismos activados en las interacciones específicas planta-HMA-nematodo son variables y dependen de la especie de hongo, la planta huésped y el nematodo. Es por eso que en este estudio se busca analizar el potencial de las tres cepas de micorrizas disponibles para el control de *N. aberrans*, y evaluar la respuesta fisiológica y bioquímica a la inoculación en plantas de pimiento cultivadas en presencia del nematodo en el suelo.

### 3.2- OBJETIVOS

1. Analizar el potencial de diferentes hongos micorrizicos en el control del falso nematodo agallador.

2. Evaluar la respuesta a la inoculación con hongos micorrícicos en plantas de pimiento crecidas en presencia de *N. aberrans*, utilizando parámetros bioquímicos, morfológicos y fisiológicos.

### 3.3- ENSAYO EXPERIMENTAL

#### - Materiales y métodos

##### Preparación del inóculo micorrícico

Se utilizaron los hongos MA *Funneliformis mosseae*, Schenck & Smith aislado GA1 y *Rhizophagus intraradices* (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe (Banco de Glomeromycota In Vitro BGI. Buenos Aires, Argentina) cepas B1 y A2. La multiplicación se realizó con trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y lotus (*Lotus tenuis* L.), como plantas trampa con que se cultivaron en un sustrato compuesto por perlita-vermiculita- arena (1:1:1), previamente tinalizado (100°C durante 1 hora por día, tres días consecutivos). Las plantas se mantuvieron en cámaras de crecimiento (25 +/- 2 °C, fotoperíodo de 16 horas y 350  $\mu\text{moles. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de irradiancia) durante 90 días. Al cabo de ese tiempo, las plantas se dejaron secar para luego eliminar la parte aérea. Las raíces se cortaron en fragmentos pequeños mezclándolas en forma homogénea con el sustrato, constituyendo el inóculo, una mezcla de sustrato, hifas, esporas y fragmentos de raíces de trébol y lotus micorrizadas en un 90%, con una densidad de 60 esporas.g<sup>-1</sup> de sustrato (Imagen 3.1).

Las plantas que se utilizaron en el ensayo se inocularon a la siembra con 30% v/v de este inóculo.



**Imagen 3.1:** Plantas trampa de *Lotus tenuis* y *Trifolium repens* para la producción de inóculo de micorrizas en cámara de crecimiento (Imagen propia).

### - Ensayo

El ensayo se realizó en un invernáculo del INFIVE (Instituto de Fisiología Vegetal), La Plata, durante los meses de diciembre del 2017 y marzo del 2018. Se sembraron semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L. 'Paco f1'), previamente desinfectadas con NaOCl (10%) durante 5 minutos, en bandejas speedlings de 72 celdas. El sustrato utilizado para llenar las celdas estaba formado por una mezcla de perlita:vermiculita (1:1 v/v) previamente autoclavado. Las bandejas fueron mantenidas en cámara de cultivo hasta el trasplante y la provisión de nutrientes se realizó semanalmente utilizando la solución nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). Treinta días después de la siembra (DDS), se realizó el trasplante a macetas de plástico de 5 Kgs previamente rellenas con sustrato compuesto por una mezcla de perlita y vermiculita (2:1) tinalizada a 100°C durante 60 minutos, durante 3 días consecutivos, para eliminar HMA y microorganismos patógenos. El inóculo (10% del peso del sustrato), constituido por una mezcla de suelo, esporas (60 esporas. g<sup>-1</sup> inóculo) micelio y fragmentos de raíz de *T. repens* y *Lotus tenuis* colonizados por *F. mosseae* (FM) o *R. intraradices* (RI B1 o RI A2), se añadió al sustrato en el momento de la siembra. Se añadió la misma cantidad de inóculo esterilizado a macetas no inoculadas para proporcionar las mismas condiciones de suelo (NI). Cuando la colonización radicular fue de aproximadamente 50%, las plantas jóvenes de pimiento inoculadas y no inoculadas se trasplantaron a macetas de 10 kg que contenían sustrato tinalizado compuesto por una mezcla de tierra y arena (2:1). Tres días después del trasplante (DDT), las macetas se inocularon con 5000 huevos del nematodo fitoparásito *Nacobbus aberrans*. Como se explicó en el capítulo anterior, el inóculo de *N. aberrans* se obtuvo de raíces de tomate infectadas. Para la inoculación se abrieron tres orificios de aproximadamente 2 cm de profundidad junto a las plántulas con la ayuda de una varilla de vidrio. Después de abrir los orificios, se depositaron 5 ml de la solución con los huevos en cada planta utilizando una pipeta automática, y luego se cerraron con sustrato tomado de la maceta.

Los tratamientos fueron (Imagen 3.2):

a) plantas de pimiento sin *N. aberrans* (N0):

1- plantas sin micorrizas (NI),

2- plantas inoculadas con *F. mosseae* (FM),

3- plantas inoculadas con *R. intraradices* B1 (RI B1),

4- plantas inoculadas con *R. intraradices* A2 (RI A2).

b) plantas de pimiento con *N. aberrans* (N1):

1- plantas sin micorrizas (NI),

2- plantas inoculadas con *F. mosseae* (FM),

3- plantas inoculadas con *R. intraradices* B1 (RI B1),

4- plantas inoculadas con *R. intraradices* A2 (RI A2).



**Imagen 3.2:** Plantas de pimiento inoculadas y no inoculadas con las tres cepas de micorrizas en presencia y ausencia de *N. aberrans* (Imagen propia).

Semanalmente se midió la altura de las plantas, calibre del tallo e índice de verdor. Una vez finalizado el ensayo, a los 90 DDT, se realizó un muestreo de la parte aérea y de raíz. Para el análisis los resultados fueron organizados en 4 grupos: variables referidas a los HMA; indicadores de la población del nematodo; parámetros de crecimiento e indicadores de estrés en las plantas.

Indicadores de población de nematodos (explicados en el capítulo anterior):

- Cantidad de huevos de nematodos de las raíces extraídos mediante el método de Hussey & Barker (1973). Y separados y purificados por el método de Coolen (1979).
- Factor de reproducción del nematodo (Oostenbrink, 1966).

Parámetros relacionados a los hongos micorrizicos

- Presencia de hongos micorrizicos mediante la tinción de las raíces por el método de Phillips & Hayman, (1970).

Las raíces se aclararon con KOH al 10% (p/v) (10 minutos, 100 °C). Luego se lavaron tres veces con agua destilada y se aplicó una solución de HCl 0,1N (5 minutos a T° ambiente). Finalmente se tiñeron con azul de tripán (5 minutos a 95°C). El colorante tiñe de color azul las estructuras del hongo que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de los HMA. Luego las raíces se conservaron en una solución de lacto-glicerol (Imagen 3.3).



**Imagen 3.3:** Raíces de pimiento teñidas con azul de tripan por el método de Phillips y Hayman, (1970) (Imagen propia).

- Porcentaje de micorrización o colonización micorrícica por el método de Trouvelot *et al.* (1986).

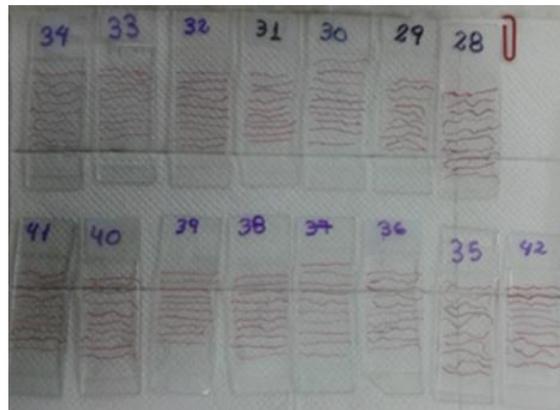
Fragmentos de raíces teñidas, de aproximadamente 1cm de longitud, se montaron en portaobjetos añadiendo gotas de ácido láctico y se cubrieron con un cubreobjeto observándose al microscopio óptico. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento, analizando 30 fragmentos de raíces por planta. De cada muestra se observó la presencia de campos negativos (sin presencia de estructuras fúngicas) y positivos (con presencia de estructuras fúngicas). En los campos positivos se tuvo en cuenta el tipo de estructuras (arbusculos, vesículas, hifas) presentes dentro de la raíz. El porcentaje de micorrización (M%) se calculó como la proporción de raíces infectadas sobre el número total de fragmentos de raíz analizados.

- Viabilidad de las estructuras fúngicas por el método de Smith & Gianinazzi-Pearson, (1990).

La determinación de la viabilidad de las estructuras fúngicas se determinó evaluando la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (% SDH), basada en el porcentaje de micorrización. Fragmentos de raíces se colocaron durante 18 horas en una solución 0,2

M de Tris-HCL, pH 7; 2,5M de succinato de sodio.6H<sub>2</sub>O; 5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 4 mg/mL de nitroblue tetrazolium. Pasado ese tiempo, se aclararon con una solución de hidrato de cloral al 75%. Por último, se colocaron en una solución de fucsina-ácida al 0,01% en ácido láctico durante 8 minutos a 90 °C.

Los fragmentos de raíces teñidos con fucsina ácida, se dispusieron en portaobjetos (Imagen 3.4) de la misma manera que aquellos teñidos con azul de Tripán, y se cuantificó el porcentaje de raíces que presentaban actividad observándose las estructuras del hongo coloreadas de azul.



**Imagen 3.4:** Portaobjetos con raíces teñidas con fucsina ácida para cuantificación por microscopio (Imagen propia).

#### Determinación de parámetros de crecimiento (explicados en el capítulo anterior).

- Contenido de clorofila y carotenos según el método de Wellburn (1994).
- Contenido de proteínas solubles mediante el método de Bradford (1976).

#### Determinación de parámetros de estrés (explicados en el capítulo anterior).

- Contenido de prolina mediante el método de Bates *et al.* (1973).
- Contenido de Azúcares totales y reductores mediante el método de Cronin & Smith (1979).
- Contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Singleton & Rossi, (1965), con modificaciones.
- Conductividad relativa de las membranas celulares de hojas y raíces mediante el método de Lutts *et al.* (1996).

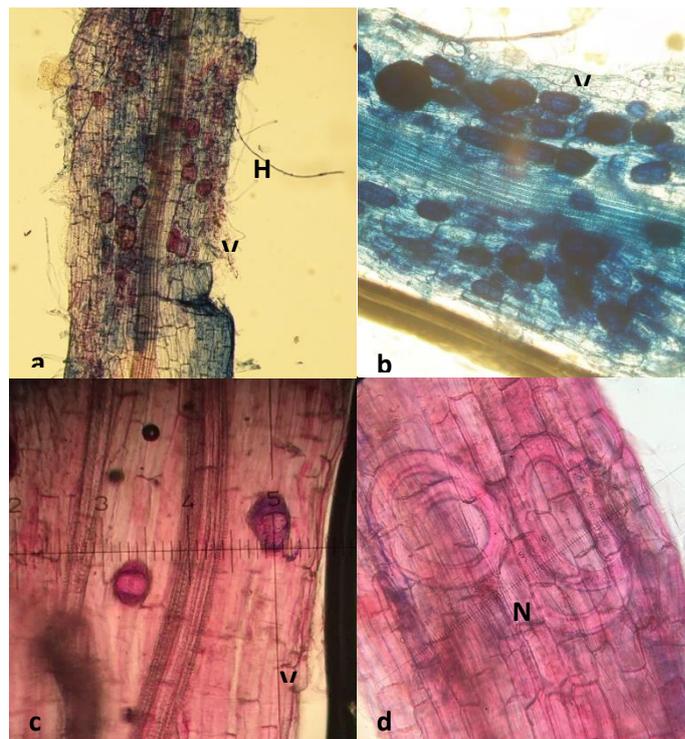
- Contenido de MDA mediante el método de Heath & Packer (1968).

### Diseño experimental

El estudio se realizó en un diseño completamente al azar, en un esquema factorial 4 x 2, de cuatro condiciones micorrícicas (NI, FM, RI B1, RI A2) y dos condiciones de infección del suelo (sustrato N0, N1). En total, se realizaron 10 repeticiones por tratamiento, cada una de las cuales comprende una planta. Los resultados se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y los valores medios se compararon mediante LSD a un nivel de significancia de 0,05. Para el análisis estadístico, todos los valores porcentuales de inoculación se transformaron en arcoseno para mejorar la homogeneidad.

### 3.4- RESULTADOS

El porcentaje de micorrización (%M) fue mayor en las plantas parasitadas por el nematodo. El tratamiento con RI B1 presentó el mayor porcentaje, siendo 54% superior al observado en los tratamientos en ausencia del nematodo. Por otro lado, la viabilidad de las estructuras fúngicas, expresada por la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (%SDH) disminuyó en presencia de *N. aberrans* (Imagen 3.5), siendo estadísticamente significativa para RI A2 (N1), quien registró una disminución del 64,2% con respecto a RI A2 (N0), el mismo tratamiento pero en ausencia del nematodo (Tabla 3.1).



**Imagen 3.5:** Raíces de pimiento teñidas con azul de tripan (**a y b**) y con fucsina ácida (**c y d**). H: Hifas; V: Vesículas; N: Nematodos (Imagen propia).

**Tabla 3.1:** Porcentaje de micorrización (%M) y viabilidad micorrícica (%SDH) de plantas de pimiento inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): *Funneliformis mosseae* (FM), *Rhizophagus intraradices* B1 (RI B1), y *Rhizophagus intraradices* A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

<i>N. aberrans</i>	HMA	% M	% SDH
N0	FM	34,53 Ab	19,97 Aa
	RI B1	31,06 Ab	9,95 Bb
	RI A2	37,70 Ab	20,25 Aa
N1	FM	37,80 Bb	18,50 Aa
	RI B1	47,70 Aa	9,00 Bb
	RI A2	38,80 Bb	7,25 Bb

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre HMA para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

Se observó una reducción significativa en el número de huevos del nematodo (expresados como número de huevos totales y número de huevos por gramo de peso fresco de raíz) y en el factor de reproducción (población final x población inicial<sup>-1</sup>), en los tratamientos inoculados con los HMA y *N. aberrans* comparado con el tratamiento inoculado sólo con *N. aberrans*. No se observaron diferencias significativas entre los distintos HMA estudiados (Tabla 3.2). En las plantas inoculadas con FM el número de huevos totales disminuyó 88,8% respecto del control sin HMA, 92,95% con RI B1 y 87,09% con RI A2.

**Tabla 3.2:** Número de huevos totales, número de huevos por gramo de peso fresco de raíz y factor de reproducción (Fr) de *N. aberrans* de plantas de pimiento inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): *Funneliformis mosseae* (FM), *Rhizophagus intraradices* B1 (RI B1), y *Rhizophagus intraradices* A2 (RI A2).

HMA	N° huevos totales	N° huevos.gr <sup>-1</sup>	Fr
NI	182000 a	2476,91 a	36,40 a
FM	20333 b	485,42 b	4,85 b
B1	12833 b	266,16 b	2,57 b
A2	23500 b	460,34 b	4,40 b

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre HMA.

El contenido de clorofila y proteínas solubles fue significativamente menor en las plantas parasitadas por *N. aberrans* (Tabla 3.3). En clorofila no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados con HMA para una misma condición de infección con el nematodo, sin embargo, hay diferencias significativas en los tratamientos con y sin nematodos para un mismo HMA (Tabla 3.3). El contenido de carotenos mostró el mismo comportamiento. Mientras que el contenido de proteínas solubles en hojas disminuyó significativamente en las plantas inoculadas con *N. aberrans*, presentando diferencias significativas también entre los tratamientos de inoculación con HMA para una misma condición de infección con el nematodo. El contenido de proteínas en raíces fue mayor en las plantas inoculadas con el nematodo, siendo FM el de mayor contenido y RI B1 el tratamiento con menor contenido de proteínas (Tabla 3.3).

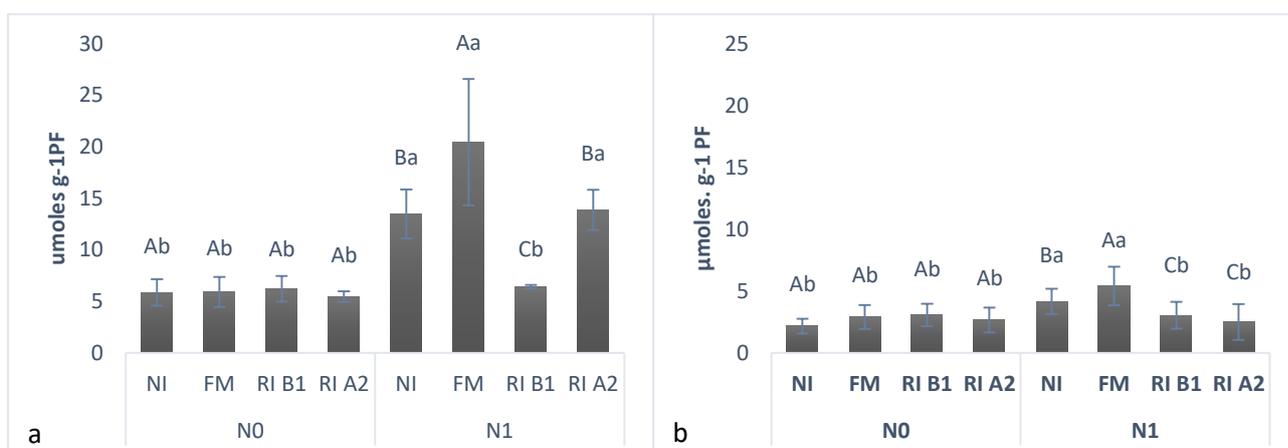
**Tabla 3.3:** Contenido de clorofila, carotenos, proteínas solubles en hojas y proteínas en raíces de plantas de pimiento inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): *Funneliformis mosseae* (FM), *Rhizophagus intraradices* B1 (RI B1) y *Rhizophagus intraradices* A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

<i>N. aberrans</i>	HMA	Clorofila ( $\mu\text{l.cm}^{-2}$ )	Carotenos ( $\mu\text{l.cm}^{-2}$ )	Proteínas de hojas ( $\mu\text{g.mg}^{-1}$ PF)	Proteínas de raíces ( $\mu\text{g.mg}^{-1}$ PF)
	NI	51,97 Aa	8,66 Aa	7,96 Aa	0,946 Ba
N0	FM	61,98 Aa	9,73 Aa	5,05 Ba	1,493 Aa
	RI B1	48,88 Aa	7,75 Aa	4,86 Ba	0,667 BCa

	RI A2	55,07 Aa	9,16 Aa	5,27 Ba	0,469 Cb
N1	NI	15,32 Ab	4,40 Ab	3,78 Ab	0,873 Ba
	FM	17,79 Ab	4,35 Ab	3,65 ABb	1,376 Aa
	RI B1	20,09 Ab	5,26 Ab	3,33 ABb	0,795 Ba
	RI A2	16,33 Ab	4,59 Ab	3,02 Bb	0,868 Ba

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre HMA para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

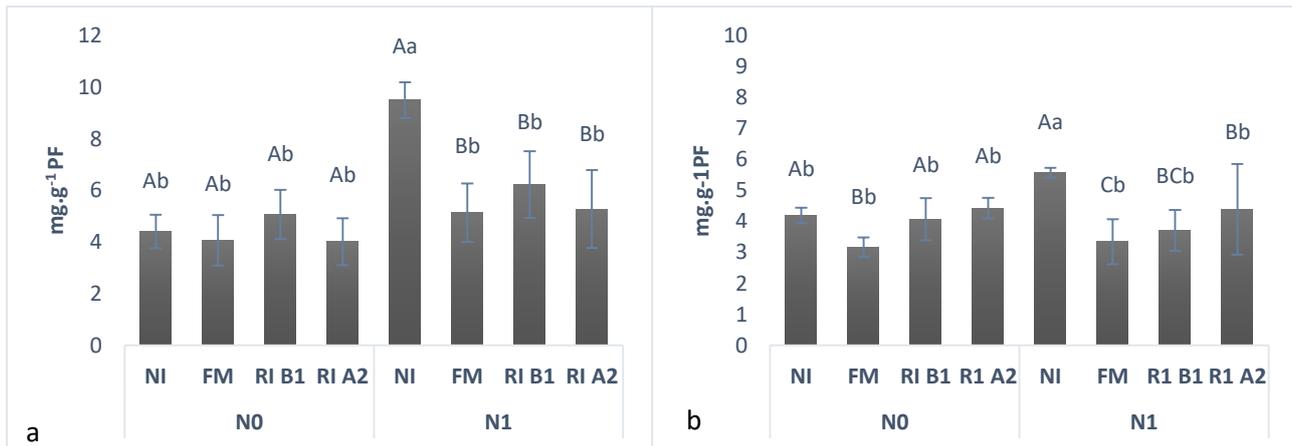
En cuanto a los parámetros indicadores de estrés evaluados, se observó mayor acumulación de prolina en hojas que en raíz, y en los tratamientos donde estaba presente el nematodo (N1). En hojas, en el tratamiento inoculado con RI B1 (en presencia del nematodo) se registró el menor contenido de prolina, mientras que en las plantas inoculadas con los otros HMA no hubo diferencias con respecto al tratamiento control (Figura 3.1a). En raíces las plantas inoculadas con las dos cepas de RI presentaron valores menores de contenido de prolina en presencia de *N. aberrans* (Figura 3.1b). El contenido de azúcares totales y reductores en hojas fue significativamente mayor en las plantas creciendo en suelo con nematodos pero sin inoculación con HMA. El contenido de azúcares reductores y totales fue significativamente menor en las plantas inoculadas con HMA en presencia del nematodo respecto a las no micorrizadas (Figura 3.2a y b). No hubo diferencias significativas en raíces por lo cual no se muestran los datos.



**Figura 3.1:** Contenido de prolina en hojas (a) y en raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA):

*Funneliformis mosseae* (FM), *Rhizophagus intraradices* B1 (RI B1), y *Rhizophagus intraradices* A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) *N. aberrans* en el suelo.

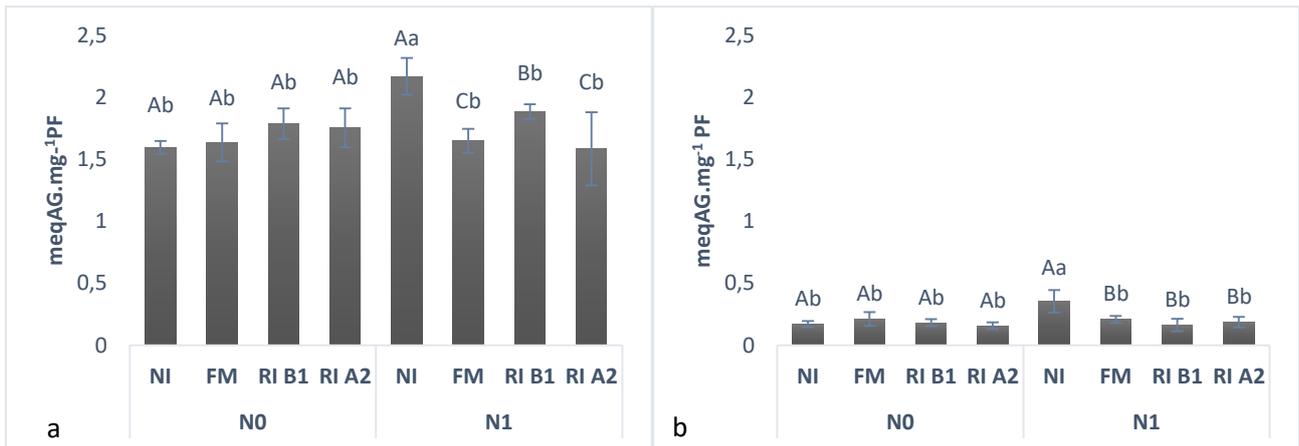
Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre HMA para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.2:** Contenido de azúcares totales (a) y reductores (b) en hojas de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): *Funneliformis mosseae* (FM), *Rhizophagus intraradices* B1 (RI B1), y *Rhizophagus intraradices* A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre HMA para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

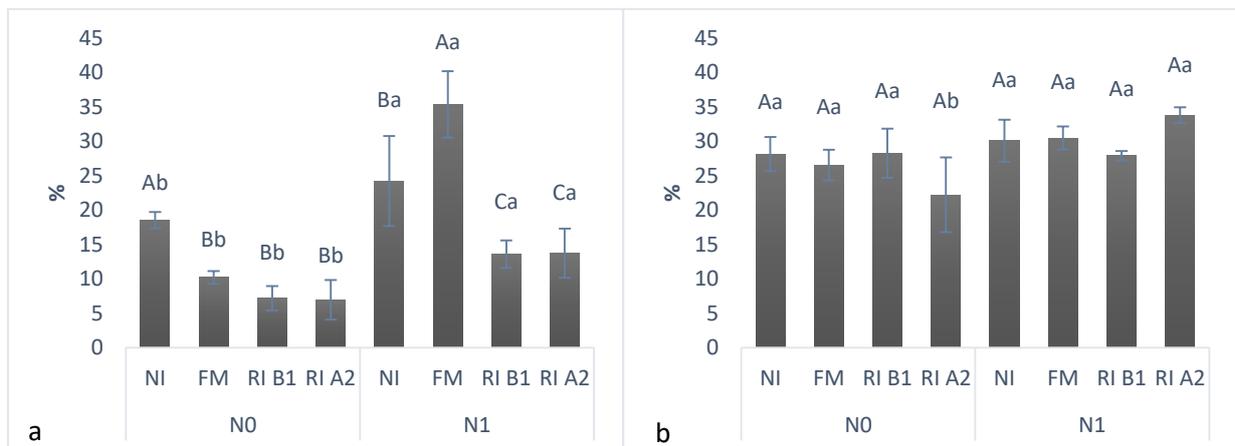
La acumulación de compuestos fenólicos aumentó significativamente en las plantas parasitadas con el nematodo comparadas con las no parasitadas, tanto en hoja como en raíz y las plantas micorrizadas presentaron contenidos significativamente inferiores. En las raíces el contenido de compuestos fenólicos es mayor que en hojas (Figura 3.3a y b).



**Figura 3.3:** Contenido de compuestos fenólicos en hojas (a) y en raíz (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): *Funneliformis mosseae* (FM), *Rhizophagus intraradices* B1 (RI B1), y *Rhizophagus intraradices* A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre HMA para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

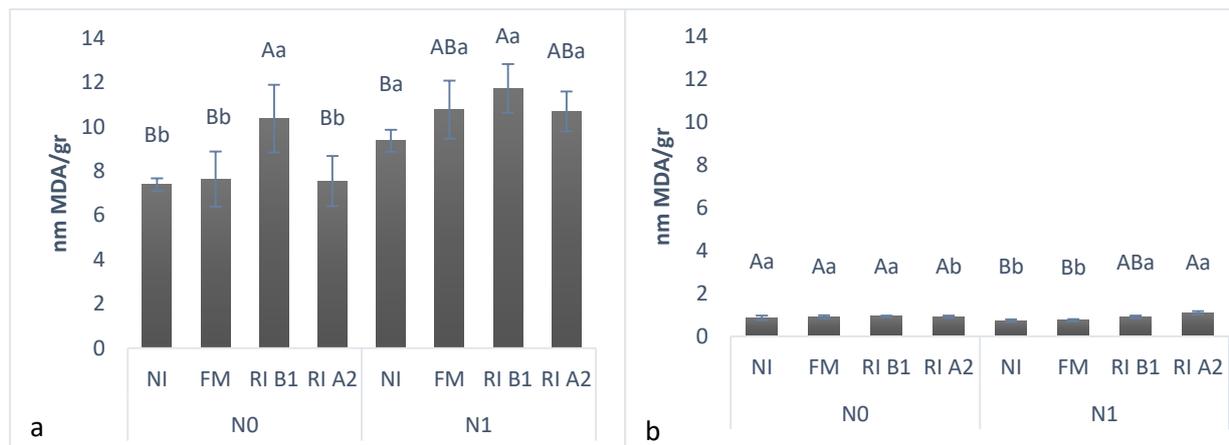
La conductividad relativa permite estimar un índice de daño en las membranas celulares. Este índice aumentó significativamente en las raíces de las plantas en presencia de *N. aberrans* producto del daño provocado en las membranas celulares por efecto de la entrada y salida de juveniles. Mientras que la inoculación con las dos cepas del hongo RI mostraron valores significativamente inferiores con respecto al control sin inoculación con HMA (Figura 3.4b). En las plantas infectadas con el nematodo e inoculadas con FM, la conductividad relativa fue la mayor observada, alcanzando valores cercanos al 40%. Por otro lado se observó también que en ausencia de infección con *N. aberrans*, las plantas inoculadas con HMA presentaron los valores más bajos de este parámetro por lo que se desprende un efecto protector de las membranas celulares por parte de los hongos micorrícicos. En hojas no hubo diferencias significativas (Figura 3.4a).



**Figura 3.4:** Conductividad relativa de membranas en hojas (a) y raíz (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): *Funneliformis mosseae* (FM), *Rhizophagus intraradices* B1 (RI B1), y *Rhizophagus intraradices* A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre HMA para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

El contenido de MDA en hojas fue mayor que en raíces (Figuras 3.5a y b). En hojas y ausencia del nematodo, el contenido de MDA fue mayor significativamente en las plantas inoculadas con RI B1 (Figura 3.5a). Comparando los NI, tanto en ausencia como en presencia del nematodo, se observó un mayor contenido de MDA en las plantas infectadas por el nematodo. En presencia del nematodo, las plantas inoculadas con las HMA fueron las que tuvieron mayor contenido de MDA comparado con NI (Figura 3.5a). En raíces, la tendencia fue al revés, las plantas en ausencia de nematodos obtuvieron mayor contenido de MDA que las plantas en presencia del nematodo. A su vez, comparando NI en ausencia como en presencia del nematodo, se observó que el NI en ausencia del nematodo tuvo mayor contenido de MDA que en presencia. En ausencia del nematodo no hubo diferencias significativas entre tratamientos. En presencia del nematodo, RI B1 y RI A2 fueron los tratamientos que tuvieron mayor contenido de MDA (Figura 3.5b).



**Figura 3.5:** Contenido de MDA en hojas (a) y raíz (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): *Funneliformis mosseae* (FM), *Rhizophagus intraradices* B1 (RI B1), y *Rhizophagus intraradices* A2 (RI A2); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre HMA para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

### 3.5- DISCUSIÓN

En el presente ensayo las plantas micorrizadas e inoculadas con el nematodo *N. aberrans* presentaron mayor porcentaje de micorrización que aquellas que no estaban parasitadas. Estos resultados coinciden con los trabajos realizados por Marro *et al.* (2014) y Lax *et al.* (2011) en plantas de tomate y de pimiento respectivamente, inoculadas con *Glomus intraradices* al transplante e infectadas con *N. aberrans*. Estos autores reportaron que la colonización micorrícica fue significativamente mayor en las plantas infectadas respecto a las no infectadas con el nematodo. Cabe aclarar que la inoculación con micorrizas de este ensayo se realizó a la siembra, por lo tanto, estos datos sugieren que la colonización temprana de las raíces por los HMA interfirió mediante algún mecanismo competitivo con la penetración de los nematodos, así como también por los fotoasimilados producidos por las plantas. Resultados similares obtuvieron Da Silva Sousa *et al.* (2010) en plantas de tomate inoculadas con *Acaulospora scrobiculata* en presencia de *M. incognita* y Alban *et al.* (2013) en plantas de café (*Coffea arabica* L.) parasitadas con *Meloidogyne exigua* donde las plantas micorrizadas en presencia de los patógenos obtuvieron mayor porcentaje de

micorrización que aquellas que no estaban parasitadas. Según Azcón-Aguilar y Barea (1996) el mayor porcentaje de micorrización en presencia de nematodos fitoparásitos puede deberse a una compensación al daño causado por los nematodos en las raíces, aumentando la formación de hifas y otras estructuras fúngicas. En este trabajo, la inoculación con HMA a la siembra redujo significativamente el número final de huevos de *N. aberrans* mostrando un efecto bioprotector sobre las raíces, al reducir el número de agallas y por ende la población final del nematodo, coincidiendo con Garita *et al.* (2019) quienes también inocularon plantas de tomate con HMA a la siembra. El establecimiento temprano de la simbiosis micorrícica retrasaría o actuaría obstaculizando la penetración de los juveniles. Algunos autores confirman que la producción de exudados por parte de los HMA, tiene un efecto adverso en los nematodos impidiendo la penetración en las raíces (Vos *et al.*, 2012a). En estudios realizados en plantas de tomate inoculadas con *G. intraradices* al trasplante e infectadas con *Nacobbus aberrans* también se observó una reducción en el número de agallas y una disminución en la reproducción del nematodo, aunque los porcentajes de micorrización reportados por estos autores son menores (Lax *et al.*, 2011; Marro *et al.*, 2014). Es posible que la inoculación a la siembra de las plantas genere una ventaja a favor de los HMA en cuanto a la ocupación del espacio físico y producción de exudados y esto explique la mayor micorrización. En raíces de duraznero (*Prunus persica*) colonizadas con *G. mosseae* se observó una reducción en la población final de *Pratylenchus vulnus* atribuida a posibles cambios fisiológicos en las raíces inducidos por las micorrizas, alterando la fuente de alimentación de los nematodos (Pinochet *et al.*, 1995). Como se mencionó en el capítulo anterior, a nivel celular, se han registrado alteraciones de la apariencia y fisiología de las células que corresponden a respuestas de hiperplasia e hipertrofia (Hewezi & Baum, 2013), es por ello que la permeabilidad selectiva de las membranas celulares puede verse afectado ya que ante situaciones de estrés se altera la integridad celular y la capacidad de retención de sustancias intracelulares (Beltrano *et al.*, 2013) razón por la cual se incrementa la conductividad relativa de los tejidos debido a la salida de electrolitos. En este trabajo la conductividad fue mayor en las plantas infectadas con *N. aberrans* y no micorrizadas, debido a las heridas causadas por la entrada y salida de juveniles y a la formación de agallas. La conductividad relativa en ausencia del nematodo y en las plantas inoculadas con RI B1 y RI A2 e infectadas con *N. aberrans* fue significativamente menor en raíces. Esta respuesta podría deberse a que la colonización temprana de las raíces por los HMA interfirió con la penetración de los nematodos o por acción de los exudados micorrícicos. Un estudio reveló que la penetración del nematodo *M. incognita* se redujo en plantas de tomate micorrizadas y que los exudados de raíces micorrícicas contribuyeron a este

proceso, debido a un efecto negativo sobre el nematodo y su motilidad en el suelo (Vos *et al.*, 2012a). Por otra parte, los exudados micorrizicos redujeron la penetración de *Rodophulus similis* en plantas de banana en comparación a las plantas no inoculadas (Vos *et al.*, 2012b). El ensayo mostró, al igual que el ensayo experimental del capítulo uno, que en presencia de *N. aberrans*, el contenido de clorofila y contenido de proteínas solubles en hoja disminuye. También mostró que las plantas micorrizadas en presencia del nematodo tuvieron mayor contenido de clorofila que el tratamiento sin micorrizar. Sharma & Sharma (2017) observaron que el contenido de clorofila a, b y total mejoró significativamente (50%) en todas las plantas de tomate tratadas con *Rhizophagus irregularis* en presencia *Meloidogyne incognita*.

Como se mencionó en el capítulo 1 y 2, las alteraciones provocadas por las agallas derivan en la ruptura del xilema y el floema. Como consecuencia de esa ruptura se reduce el flujo de sustancias a través de los tejidos de conducción (Castillo y Marbán-Mendoza, 1984; Inserra *et al.*, 1985). Lo que deriva en un déficit de absorción de agua provocando déficit hídrico en las plantas. Estas condiciones ocasionan un incremento sistémico de sustancias asociadas que, como tales, resultan útiles como “marcadores” del estrés hídrico. La acumulación de prolina y azúcares son el resultado de una modificación de la expresión génica, relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos en las plantas como respuesta al estrés hídrico. (Shahba *et al.*, 2010). Ruscitti *et al.* (2015) mostraron como las plantas de tomate no inoculadas fueron más afectadas por el estrés hídrico respecto a las inoculadas con *F. mosseae* y *R. intraradices*, evidenciado por los mayores valores de prolina registrados, coincidiendo con lo observado en este trabajo. En este ensayo, la acumulación de prolina fue mayor en las plantas infectadas con *N. aberrans* coincidiendo con Garita *et al.* (2018) quienes observaron en plantas injertadas y sin injertar de tomate en presencia de *N. aberrans* un aumento en la acumulación de prolina. En las plantas inoculadas con *Rizophagus intraradices* B1 y en presencia de *N. aberrans* la acumulación fue menor tanto en hojas como en raíces mostrando una menor expresión del estrés, esto podría relacionarse con la reducción en el número de agallas en las raíces y por ende menor ruptura de los vasos de conducción. El aumento en el contenido de azúcares también es consecuencia del estrés osmótico provocado, ya sea por el deficit hídrico o por la salinidad (Yang *et al.*, 2010). En este caso, la acumulación de azúcares totales y reductores disminuyó en las plantas inoculadas con los tres hongos micorrizicos ensayados y en presencia del nematodo con respecto a las plantas infectadas sin inocular. Villareal-Navarrete (2013) observó que en plantas de *Physalis peruviana* sometidas a estrés por inundación e infectadas con *Fusarium* presentaron elevados valores de prolina y azúcares. Los

compuestos fenólicos tienen un lugar significativo en los mecanismos involucrados en la interacción planta – nematodo. Estos compuestos se acumulan en los sitios de localización del nematodo, mientras que el contenido en los órganos de la planta no afectados por la infección puede incrementarse varias veces (incremento sistémico), ya que son capaces de traslocarse a través de los tejidos principalmente vía floema (Arias *et al.*, 2009). En este trabajo se observó una baja acumulación de estos compuestos en las plantas micorrizadas y en presencia del nematodo con respecto al tratamiento con *N. aberrans* y sin micorrizar. La baja acumulación de osmolitos y de compuestos fenólicos puede deberse a que los hongos micorrizicos aumentan la tolerancia del huésped al ataque del patógeno principalmente por el mantenimiento de actividad celular de la raíz a través de la formación de los arbusculos (Azcon-Aguilar & Barea, 1996). Como consecuencia de estos mecanismos se afecta menos la absorción de agua y nutrientes y en consecuencia, el normal funcionamiento de los procesos fisiológicos.

En conclusión, de acuerdo a los resultados obtenidos en este ensayo, el uso de HMA a la siembra produjo una reducción en la población de *Nacobbus aberrans* y en consecuencia una mejor respuesta de las plantas de pimiento sometidas a estas condiciones. Esto demuestra que la inoculación con HMA a la siembra podría constituirse en una estrategia clave y eficiente para competir por espacio en la raíz y nutrientes anticipándose a la infección de nematodos fitoparásitos en especies hortícolas, en especial en producciones bajo invernáculo.

Las tres cepas utilizadas consiguieron reducir la población de *N. aberrans* en las plantas de pimiento. Sin embargo, *Rhizophagus intraradices* B1 ha demostrado según los resultados analizados una mayor incidencia en la sobrevivencia fúngica, el crecimiento de las plantas y la atenuación del estrés que provoca *N. aberrans*.

### 3.6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alban, R., Guerrero, R., & Toro, M. (2013). Interactions between a root knot nematode (*Meloidogyne exigua*) and arbuscular mycorrhizae in coffee plant development (*Coffea arabica*). *American Journal of Plant Sciences*, 4(07), 19.

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 de Protección Vegetal*, 24(1), 1–13.

- Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (1997). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soilborne plant pathogens – An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6(6), 457–464.
- Banuelos, J., Alarcón, A., Larsen, J., Cruz-Sánchez, S., & Trejo, D. (2014). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Meloidogyne incognita* in the ornamental plant *Impatiens balsamina*. *Journal of soil science and plant nutrition*, 14(1), 63-74.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for waterstress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207.
- Baum, C., El-Tohamy, W., & Gruda, N. (2015). Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Scientia horticulturae*, 187, 131-141.
- Beltrano, J., Ruscitti, M., Arango, C., & Ronco, M. (2013). Effects of arbuscular mycorrhiza inoculation on plant growth, biological and physiological parameters and mineral nutrition in pepper grown under different salinity and P levels. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13, 123– 141.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248– 254.
- Castillo, P. G., & Marbán-Mendoza, N. (1984). Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne & Allen 1944 en raíces de *Capsicum annum* y *C. baccatum*. *Agrociencia*, 56, 85–93.
- Coolen, W. A. (1979). Methods for the extraction of *Meloidogyne spp.* and other nematodes from roots and soil. In F. Lamberti & C. E. Taylor (Eds.), *Root-knot nematodes (Meloidogyne species) systematics, biology and control* (pp. 317–330). Academic Press.
- Cronin, D. A., & Smith, S. (1979). A simple and rapid procedure for the analysis of reducing, total and individual sugars in potatoes. *Potato Research*, 22(2), 99–105.
- Da Silva Sousa, C., Fermino Soares, A. C., Coimbra, J. L., Da Silva Garrido, M., & Da Silva Machado, G. (2010). Fungos micorrízicos arbusculares no controle de *Meloidogyne incognita* em mudas de tomateiro. *Rev Caatinga*, 23: 15-20.
- Frew, A., Powell, J. R., Glauser, G., Bennett, A. E., & Johnson, S. N. (2018). Mycorrhizal fungi enhance nutrient uptake but disarm defences in plant roots, promoting plant-parasitic nematode populations. *Soil Biology and Biochemistry*, 126, 123–132.

- Garita, S. A., de Almeida Guimaraes, M., Arango, M. C., de Jesus Tello, J. P., & Ruscitti, M. (2018). Performance of tomato rootstocks in False Root-knot Nematode (*Nacobbus aberrans*) infested soil. *Australian Journal of Crop Science*, 12(11), 1725.
- Garita, S. A., Bernardo, V. F., Guimarães, M. D. A., Arango, M. C., & Ruscitti, M. F. (2019). Mycorrhization and grafting improve growth in the tomato and reduce the population of *Nacobbus aberrans*. *Revista Ciência Agronômica*, 50(4), 609-615.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
- Hewezi, T., & Baum, T. (2013). Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(1), 9–16.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station, 347(2nd edit).
- Hussey, R. S., & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.*, including a new technique. *Plant Disease Report*, v. 57, p. 1025-1028.
- Inserra, R. N., Griffin, G. D., & Anderson, J. L. (1985). The false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. Utah agricultural experiment station research bulletin, (510).
- Korayem, A. M., El-Bassiouny, H. M. S., & Abd El-Monem, A. A. (2012). Physiological and biochemical changes in different sugar beet genotypes infected with root-knot nematode. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5), 1847–1861.
- Lax, P., Becerra, A., Soteras, F., Cabello, M., & Doucet, M. E. (2011). Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* in tomato plants. *Biology Fertility Soils*, 47:591–597.
- Lutts, S., Kinet, J. M., & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78(3), 389–398.
- Marro, N., Lax, P., Cabello, M., Doucet, M. E., & Becerra, A. G. (2014). Use of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as biological control agent of the nematode *Nacobbus aberrans* parasitizing tomato. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), 668-674.
- Oostenbrink, M. (1966). Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Major characteristics of the relation between nematodes and plants*, (66-4).

- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158–161.
- Pinochet, J., Calvet, C., Camprubi, A., & Fernandez, C. (1995). Growth and nutritional response of Nemared peach rootstock infected with *Pratylenchus vulnus* and the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Fundamental and applied Nematology*, 18(3), 205-210.
- Ruscitti, M., Garita, S., Arango, M. C., & Beltrano, J. (2015). Inoculación con aislamientos seleccionados de hongos vesículo-arbusculares como alternativa para moderar el estrés hídrico en plantas de tomate platense bajo condiciones de invernáculo. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 114(2), 219–229.
- Schouteden, N., De Waele, D., Panis, B., & Vos, C. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant-parasitic nematodes: a review of the mechanisms involved. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1280.
- Shahba, Z., Baghizadeh, A., Vakili, S. M. A., Yazdanpanah, A., & Yosefi, M. (2010). The salicylic acid effect on the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sugar, protein and proline contents under salinity stress (Na Cl). *Journal of Biophysics and structural Biology*, 2(3): 35-41.
- Sharma, I. P., & Sharma, A. K. (2017). Co-inoculation of tomato with an arbuscular mycorrhizal fungus improves plant immunity and reduces root-knot nematode infection. *Rhizosphere*, 4, 25–28.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Smith, S. E., & Gianinazzi-Pearson, V. (1990). Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: Effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology*, 17, 177–188.
- Trouvelot, A., Kough, J. L., & Gianinazzi-Pearson, V. (1986). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En: 'Physiological and genetical aspects of mycorrhizae'. INRA, Paris, 101-109.
- Villarreal-Navarrete, A., Fischer, G., Melgarejo, L. M., Correa, G., & Hoyos-Carvajal, L. (2014). Growth response of the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) to waterlogging

stress and *Fusarium oxysporum* infection. In *XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014)*: 1178 (pp. 161-168).

Vos, C., Claerhout, S., Mkandawire, R., Panis, B., De Waele, D., & Elsen, A. (2012a). Arbuscular mycorrhizal fungi reduced root-knot nematode penetrations through altered root exudation of their host. *Plant and Soil*, 354(1-2), 335–345.

Vos, C., Van Den Broucke, D., Lombi, F. M., De Waele, D., & Elsen, A. (2012b). Mycorrhiza induced resistance in banana acts on nematode host location and penetration. *Soil Biology and Biochemistry*, 47, 60–66.

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls A and B, as well as total carotenoids, using various solvents with Spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313.

Yang, Y., & Guo, Y. (2018). Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytologist*, 217(2), 523–539.

## **Capítulo 4**

# **Hongos nematófagos con potencial antagonismo sobre de *Nacobbus aberrans*.**

#### 4.1- INTRODUCCIÓN

Siguiendo con la línea del capítulo anterior, este capítulo se centrará en el estudio de hongos nematófagos para el control de *N. aberrans*. Como se mencionó anteriormente existen cuatro grupos de hongos nematófagos según la manera de atacar a los nematodos. En este estudio se utilizaron un hongo parásito *Paecilomyces lilacinum* actualmente llamado *Purpureocillium* (Luangsa-Ard *et al.*, 2011) y un productor de toxinas que es *Pleurotus ostreatus*.

Las hifas de *P. lilacinum* penetran fácilmente los huevos de los nematodos, los cuales una vez invadidos se hinchan como resultado de la alteración de la permeabilidad de la pared y sufren una serie de cambios estructurales (Mukhtar *et al.*, 2013). En la mayoría de los casos el hongo no sólo ataca las masas de huevos, sino también penetra en el cuerpo de las hembras adultas ovíparas y las destruye. Después de la adhesión *P. lilacinum* forma un apresorio para lograr la penetración. Se ha demostrado que *P. lilacinum* penetra directamente todos los estados del nematodo luego de la formación del apresorio. Esta estructura libera enzimas para degradar los sustratos adyacentes con lo que establece un punto de infección mucho más estrecho y así lograr la penetración del huésped (Gunasekera *et al.*, 2002).

Los hongos del género *Pleurotus* (Basidiomycota) son potentes agentes biológicos que pueden crecer a expensas de los residuos agrícolas (sustratos) y diferenciar fructificaciones aptas para el consumo humano. La mayoría de las especies del género *Pleurotus* infectan nematodos colonizándolos. Las especies que más se han investigado son *P. ostreatus*, *P. florida*, *P. sajor-caju*, *P. eryngii*, y *P. cornucopiae* (Hibbett & Thorn, 1994). Entre los mecanismos implicados en la actividad nematocida, el hongo descomponedor de madera *Pleurotus ostreatus* produce toxinas tales como el ácido trans-2 decenodioico (Kwok *et al.*, 1992), que al entrar en contacto con los nematodos causan la inmovilización de éstos en cuestión de 30 segundos, posteriormente las hifas penetran a través de los orificios del nematodo colonizándolo al cabo de 24 a 48 hs y digieren completamente al huésped a los 2 o 3 días, utilizando su contenido como fuente de nitrógeno (Sierra Monroy, 2014). A su vez produce otras importantes biomoléculas como (lectinas, enzimas hidrolíticas) y ácidos orgánicos, que resultan de interés por su actividad biológica (Papaspyridi *et al.*, 2011). Estos hongos son de fácil reproducción, rápido crecimiento e inoocuos para el ser humano, lo que los hace factibles de ser estudiados como potencial bioinsumo en el control de nematodos de cultivos hortícolas.

## 4.2- OBJETIVOS

1. Analizar el potencial de diferentes hongos nematófagos en el control del falso nematodo agallador.
2. Evaluar la respuesta a la inoculación con hongos nematófagos en plantas de pimiento crecidas en presencia de *N. aberrans*, utilizando parámetros bioquímicos, morfológicos y fisiológicos.
3. Evaluar el efecto de la aplicación de hongos con potencial actividad nematicida y/o promotora del crecimiento vegetal sobre la carga de microorganismos asociados al suelo rizosférico de plantas de pimiento crecidas en presencia de *N. aberrans*.

## 4.3- ENSAYO EXPERIMENTAL

### - Materiales y métodos:

#### Preparación del inóculo

Se utilizaron cepas de *Purpureocillium lilacinum* PSCL# 876 obtenidas del cepario del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, CINDEFI (UNLP) y de *Pleurotus ostreatus* proveniente del cepario del Laboratorio de Micología y Cultivo de Hongos Comestibles y Medicinales del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIBIO). Para la multiplicación del inóculo se repicaron los hongos en cajas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado (APG) 1,5%, pH 6. Se incubaron en oscuridad a 28-30°C aproximadamente durante 7-10 días hasta que el medio de cultivo se observó completamente colonizado. Luego ese medio se utilizó para inocular botellas de vidrio y bolsas de autoclaves con medios formulados con semillas de avena y viruta de madera de Salicáceas (1:1) (Chang & Miles, 2014). La incubación de los cultivos bajo condiciones de fermentación en estado sólido se realizó en cámara de cultivo a 28°C y en oscuridad (Inalbón *et al.*, 2015) (Imagen 4.1).



**Imagen 4.1:** Preparación de los inóculos *P. ostreatus* y *P. lilacinum* (Imagen propia).

### - Ensayo

El ensayo se realizó en el invernáculo del Instituto de Fisiología Vegetal de la UNLP entre los meses de diciembre del 2017 y marzo del 2018. Se utilizaron semillas de pimiento Paco f1. La siembra, previa desinfección con NaOCl (10 %) durante 5 minutos, se realizó en speedlings de 72 celdas con una mezcla de perlita-vermiculita (1:1) como sustrato previamente autoclavado. Al cabo de 35-40 días aproximadamente se llevó a cabo el trasplante en macetas de 5 Kgs con una mezcla de tierra y arena (1:1) tinalizado como sustrato. En el momento del trasplante se realizó también la inoculación con los diferentes hongos utilizando 100 cm<sup>3</sup> de sustrato con micelio. Tres días después del trasplante (DDT) se inoculó a la mitad de las macetas con 5000 huevos de *N. aberrans*

Los tratamientos fueron:

(a) plantas de pimiento sin *N. aberrans* (N0):

- 1- plantas sin inoculación fúngica (NI),
- 2- plantas inoculadas con *Pleurotus ostreatus* (PO),
- 3- plantas inoculadas con *Purpureocillium lilacinum* (PL),

b) plantas de pimiento con *N. aberrans* (N1):

- 1- plantas sin inoculación fúngica (NI),
- 2- plantas inoculadas con *Pleurotus ostreatus* (PO),
- 3- plantas inoculadas con *Purpureocillium lilacinum* (PL).

Semanalmente se midió la altura, calibre del tallo e índice de verdor y cada 20 días aproximadamente se midió la conductancia estomática con porómetro Decagon SC-1. Una vez finalizado el ensayo, a los 90 DDT, se realizó un muestreo de la parte aérea y de raíz. Se analizaron los resultados en 4 grupos: indicadores de la población del nematodo; parámetros de crecimiento, indicadores de estrés en las plantas (explicados en el capítulo 2) y variable relacionada a los hongos nematófagos.

#### Indicadores de población del nematodo:

- Número de huevos de nematodos de las raíces extraídos mediante el método de Hussey & Barker (1973), y separados y purificados por el método de Coolen (1979).
- Factor de reproducción del nematodo (Oostenbrink, 1966).

#### Determinación de parámetros de crecimiento

- Contenido de clorofila y carotenos según el método de Wellburn (1994).
- Contenido de proteínas solubles mediante el método de Bradford (1976).

#### Determinación de parámetros de estrés

- Contenido de prolina mediante el método de Bates *et al.* (1973).
- Contenido de Azúcares totales y reductores mediante el método de Cronin & Smith (1979).
- Contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Singleton & Rossi, (1965), con modificaciones.
- Conductividad relativa de las membranas celulares de hojas y raíces mediante el método de Lutts *et al.* (1996).
- Contenido de MDA mediante el método de Heath & Packer (1968).
- Conductancia estomática (CS) con porómetro

#### Variables referidas a los hongos

- Persistencia de hongos en el suelo

Una vez finalizado el ensayo, se realizó también un muestreo del suelo para observar la persistencia de los hongos. Para ello se tomaron muestras de 100 gr de las macetas. De cada muestra se tomó un gramo de suelo y se colocó en tubos falcon de 10 ml. La muestra se lavó 10 veces con agua destilada. El suelo lavado se colocó en cajas de Petri con papel filtro y se llevó a estufa por 24 hs. Una vez seco, se colocaron cinco

partículas de suelo en cajas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado con 1 ml de solución de antibiótico (cloranfenicol 1 gr + estreptomina 0,5 gr en 200 ml de agua destilada). Se prepararon 3 muestras por tratamiento y 10 repeticiones por muestra. Se dejaron incubar por 7 días en oscuridad a 28°C para luego observar la formación de colonias.

#### Diseño experimental

El ensayo se realizó con un diseño completamente al azar, en un esquema factorial 3 x 2, de tres condiciones de hongos (NI, PO, PL) y dos condiciones de infección del suelo (sustrato N0, N1). En total, se realizaron 10 repeticiones por tratamiento, cada una de las cuales comprende una planta. Los resultados se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y los valores medios se compararon mediante LSD a un nivel de significancia de 0,05 utilizando el programa estadístico SISVAR 2018.

#### **4.4- RESULTADOS:**

La inoculación con hongos nematógafos disminuyó significativamente la infección de la raíces por el nematodo, a diferencia del tratamiento no inoculado con dichos hongos ya que se pudo cuantificar menor huevos de nematodos y por ende una disminución de los huevos por gramo de raíz y del Factor de reproducción (Fr) comparado con el tratamiento NI (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1:** Número de huevos totales, número de huevos/ gramos de raíz y Factor de reproducción de Oostenbrick de los tratamientos control (NI) y los tratamientos inoculados con *P. ostreatus* (PO) y *P. lilacinum* (PL) en presencia de *N. aberrans*.

Tratamiento	Huevos totales	huevos/gramo	Fr
NI	182000 a	2476,91 a	36,4 a
PO	29500 c	481,95 c	5,90 c
PL	115833 b	1730,04 b	23,17 b

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre hongos nematógafos.

En cuanto a los parámetros de crecimiento, en ausencia del nematodo los tratamientos con inóculos fúngicos obtuvieron mayor altura que en el tratamiento control (NI N0). Lo contrario sucedió con el diámetro del tallo. En presencia del nematodo las plantas inoculadas con PL tuvieron mayor altura que el tratamiento control (Tabla 4. 2). A su vez se pudo observar mayor volumen de raíz en el tratamiento PL comparado con el tratamiento PO y NI, a diferencia de los tratamientos en ausencia del nematodo en los que no se observaron diferencias entre las raíces (Imagen 4.2a y b).



**Imagen 4.2a-** Raíces de pimiento correspondientes a los tratamientos NI, PO, y PL en ausencia de *N. aberrans*. **b-** Raíces de pimiento correspondientes a los tratamientos NI, PO y PL en presencia de *N. aberrans* (Imagen propia).

**Tabla 4.2:** Altura, diámetro del tallo y conductancia estomática (G) de planta de pimiento en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* y sin inocular (NI) e inoculadas con *P. ostreatus* (PO) y *P. lilacinum* (PL).

<i>N. aberrans</i>	Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro del tallo (cm)	G (mol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )
N0	NI	65,17 Ba	8,11 Aa	148,81 Aa
	PO	74,70 Aa	7,58 Ba	89,87 Ba
	PL	74,40 Aa	7,67 Bb	156,79 Aa
N1	NI	67,00 Ba	8,36 Aa	21,60 Bb
	PO	67,36 Bb	6,79 Bb	57,90 Ab

PL 73,50 Aa 8,23 Aa 60,51 Ab

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre hongos para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

La conductancia estomática de los tratamientos en ausencia de nematodos fue significativamente más alta que en los tratamientos en presencia de nematodos. A su vez, en presencia del nematodo, los tratamientos inoculados con los hongos fueron significativamente más altos que el control (NI N1) (Tabla 4.2).

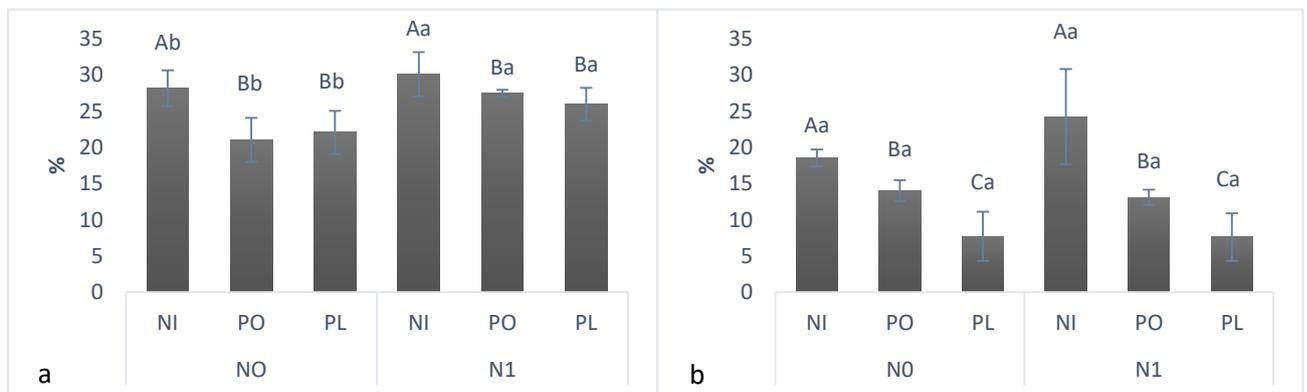
En presencia del nematodo bajó significativamente el contenido de clorofila y carotenos significativamente pero la inoculación con PO y PL aumentó el contenido de estos pigmentos en las plantas (Tabla 4.3). Con el contenido de proteínas solubles en hojas sucedió algo similar donde los tratamientos control y PO obtuvieron los mayores contenidos ( $p < 0,05$ ). Entre los tratamientos inoculados con *N. aberrans* se observó que el contenido de proteínas fue mayor en aquellos donde se inoculó con los hongos nematófagos, destacando el tratamiento PO. En raíces, en ausencia del nematodo no hubo diferencias significativas. En presencia *N. aberrans* los tratamientos PO y PL mostraron mayor contenido de proteínas que el testigo (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3:** Contenido de clorofila, carotenos, proteínas de hojas y de raíz de plantas de pimiento en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* y sin inocular (NI) e inoculadas con *P. ostreatus* (PO) y *P. lilacinum* (PL).

<i>N. aberrans</i>	Tratamientos	Clorofila ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	Carotenos ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	Proteínas Hojas ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PF)	Proteínas Raíces ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PF)
N0	NI	54,30 Aa	8,66 Aa	7,96 Aa	0,95 Aa
	PO	55,11 Aa	7,32 ABa	6,99 Aa	0,76 Ab
	PL	29,56 Ba	6,97 Aa	5,64 Ba	0,73 Ab
N1	NI	15,32 Bb	4,40 Bb	3,78 Bb	0,87 Ba
	PO	31,16 Ab	6,01 Ab	8,13 Aa	1,36 Aa
	PL	27,51 Ab	5,17 ABb	4,17 Bb	1,15 Aa

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre hongos para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

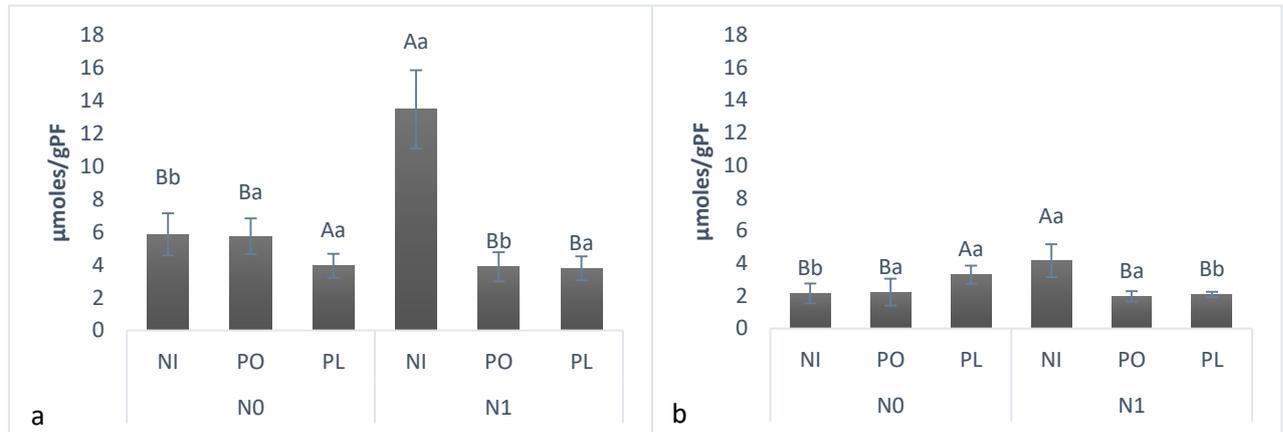
El daño en las raíces como consecuencia de la formación de agallas y la entrada/salida de los juveniles en la raíz produce como consecuencia un daño en las membranas celulares y por ende se produce pérdida de electrólitos. Una forma de medir esta pérdida es a través de la conductividad relativa. En hojas la conductividad relativa de las membranas fue mayor en los tratamientos en presencia de *N. aberrans*. En estas condiciones, la inoculación con los hongos nematófagos produjo una disminución de la CR, tanto en hojas como en raíces (Figura 4.1a y b).



**Figura 4.1:** Conductividad relativa de las membranas de hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos nematófagos: *Pleurotus ostreatus* (PO) y *Purpureocillium lilacinum* (PL); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre hongos para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

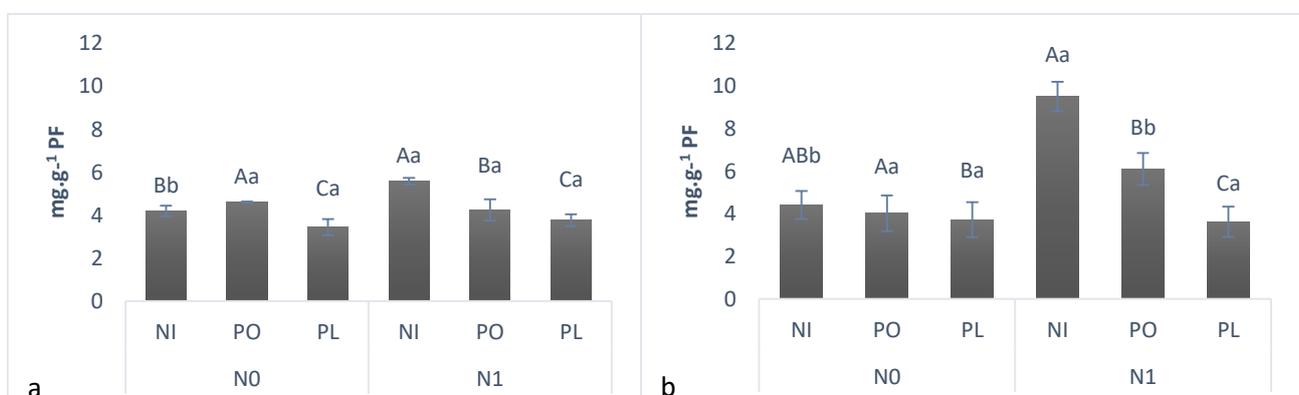
El daño por nematodos causa en las plantas daños similares a los producidos por déficit hídrico debido al daño que se produce en las raíces. Este estrés se evidencia por la acumulación de osmolitos como prolina y azúcares totales y reductores, con el fin de sostener la absorción de agua. En presencia del nematodo, el tratamiento NI acumuló mayor cantidad de prolina respecto a los tratamientos inoculados con hongos nematófagos, tanto en hojas como en raíces y a su vez se acumuló más en las hojas que en las raíces (Figuras 4.2a y b).



**Figura 4.2:** Contenido de prolina en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos nematófagos: *Pleurotus ostreatus* (PO) y *Purpureocillium lilacinum* (PL); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre hongos para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

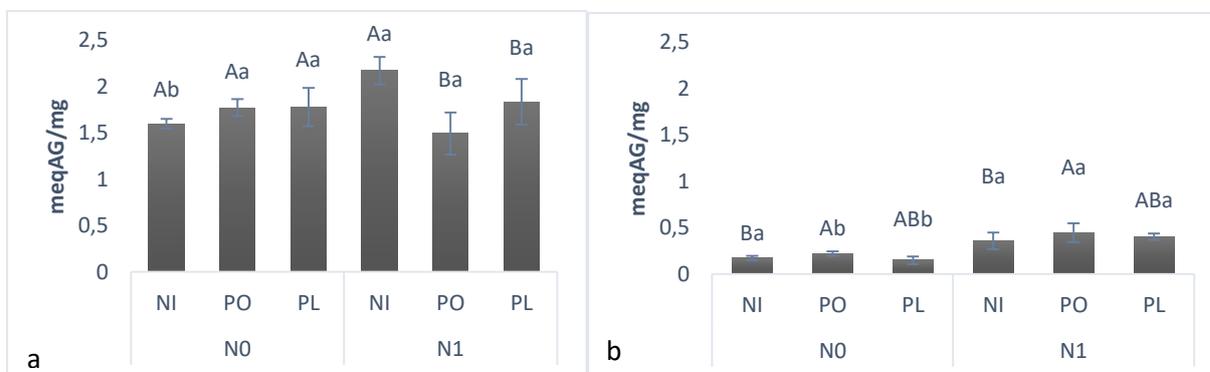
El contenido de azúcares totales en hojas fue significativamente más alto en el tratamiento NI comparado con los otros tratamientos en presencia del nematodo (Figura 4.3a). En ausencia del nematodo no hubo diferencias significativas. A su vez en presencia del nematodo el contenido de azúcares en los tratamientos fue más alto que en ausencia del nematodo (Figura 4.3a y b). El contenido de azúcares reductores en hojas fue menor ( $p < 0,05$ ) en los tratamientos inoculados con los hongos nematófagos en comparación con el tratamiento NI en presencia de *N. aberrans* (Figura 4.3b). En raíces no hubo diferencias significativas, tanto en azúcares totales como reductores (datos no mostrados).



**Figuras 4.3:** Contenido de azúcares totales en hojas (a). Contenido de azúcares reductores en hojas (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos nematófagos: *Pleurotus ostreatus* (PO) y *Purpureocillium lilacinum* (PL); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre hongos para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

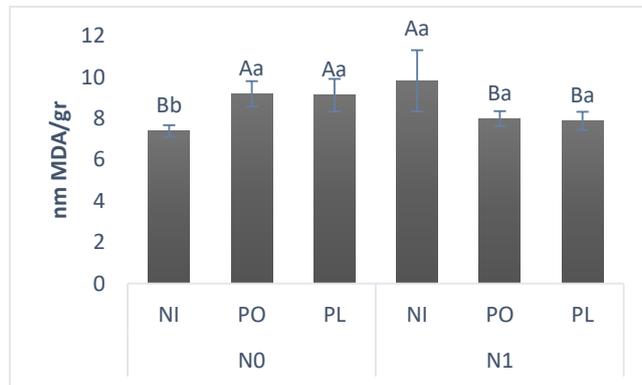
El contenido de fenoles mostró tendencias distintas en hojas y raíces. En hojas, en presencia del nematodo, los tratamientos inoculados con hongos nematófagos mostraron menor acumulación de compuestos fenólicos. En cambio, en raíces, en presencia del nematodo, los tratamientos inoculados con los hongos no presentaron diferencias significativas con NI. En ausencia del nematodo no hubo grandes diferencias entre tratamientos (Figuras 4.4a y b).



**Figuras 4.4:** Contenido de compuestos fenólicos en hojas (a) y en raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos nematófagos: *Pleurotus ostreatus* (PO) y *Purpureocillium lilacinum* (PL); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre hongos para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

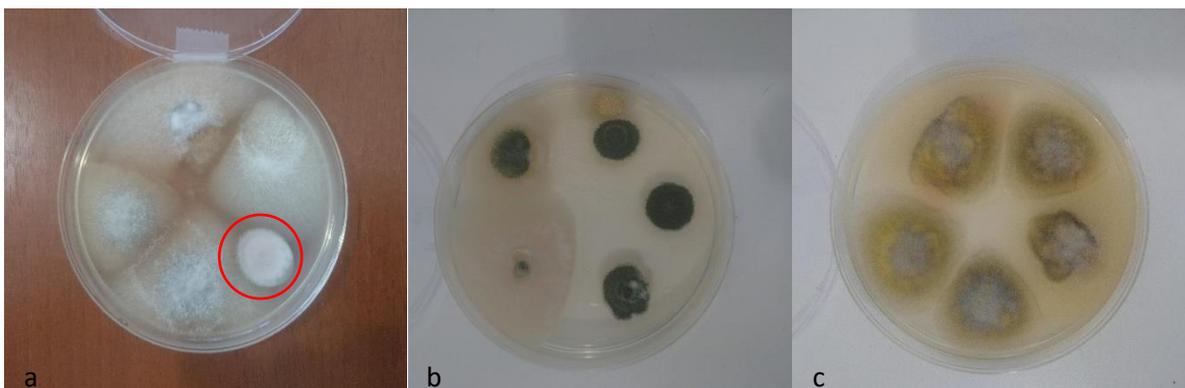
El contenido de MDA en hojas fue mayor en presencia del nematodo comparando los tratamientos NI. En ausencia del nematodo el contenido fue mayor en las plantas tratadas con PO y PL con respecto a NI ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.5). En presencia del nematodo la tendencia fue al revés, donde el tratamiento NI tuvo mayor contenido de MDA que los tratamientos PO y PL ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.5). En raíces no hubo una tendencia clara por ende no se muestran los datos.



**Figura 4.5:** Contenido de MDA en hojas de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los hongos nematófagos: *Pleurotus ostreatus* (PO) y *Purpureocillium lilacinum* (PL); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre hongos para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

Aunque no se recuperó *Pleurotus ostreatus* a partir de las partículas de suelo lavadas y analizadas, *P. lilacinum* LPSC# 876 si se detectó en el 30 % de las partículas provenientes del suelo muestreado de los tratamientos. Ninguno fenotipo similar a los dos hongos estudiados se detectó en las colonias fúngicas desarrolladas en el medio agarizado cuando las partículas sembradas correspondieron a los tratamientos sin inoculación fúngica (datos nos mostrados) (Imagen 4.3a, b y c).



**Imagen 4.3:** a- En círculo rojo se muestra la presencia de una colonia de *P. lilacinum*. b y c- Tratamientos PO y NI sin presencia de colonias de las cepas utilizadas en el ensayo (Imagen propia).

#### 4.5- DISCUSIÓN.

En este capítulo se analizó la utilización de hongos nematófagos para disminuir la población de *N. aberrans* y los efectos en las plantas de pimiento. La inoculación con los hongos realizada al trasplante redujo la infección en las raíces por parte de los nematodos. Diversos autores reportaron una importante reducción de la reproducción de poblaciones de *Meloidogyne incognita*, *M. hapla* y *M. javanica* en diferentes cultivos hortícolas como lechuga y tomate, inoculados con *P. ostreatus* y *P. lilacinum* (Kiewnick & Sikora, 2006a; Kiewnick & Sikora, 2006b; Heydari *et al.*, 2006; Khun-In *et al.*, 2015; Wille *et al.*, 2018). Si bien no hay muchos trabajos realizados con *N. aberrans* in vivo, hay trabajos realizados in vitro con *P. lilacinum* que mostraron la efectividad de este para parasitar huevos y juveniles del segundo estadio (estadio de infección) (Sosa *et al.*, 2018; Gortari & Hours, 2019). Las plantas expuestas al nematodo manifestaron marchitez, disminución del crecimiento, pérdidas del rendimiento e incluso la muerte de la planta (Cristobal *et al.*, 2001). Si bien no hubo diferencias significativas en cuanto a la altura y el diámetro del tallo, *P. lilacinum* se destacó por tener la mayor altura en comparación con los controles. Ambos hongos aumentaron también el contenido de clorofila y proteínas de las plantas ante la presencia del nematodo. Okorie *et al.*, 2011 observaron mayor peso fresco y seco de los brotes de soja inoculados con *P. ostreatus* en presencia de *M. incognita*. Roy *et al.* (2015) observaron en pimiento fertilizado con sustrato residual de *P. ostreatus* que los niveles de clorofila, carotenos y proteínas aumentaron en planta y frutos, además de promover el crecimiento en altura. En un trabajo realizado con zanahoria inoculado con *P. lilacinum* y *Aspergillus niger* expuestas a *M. javanica* y *P. carotovorum* pv. *carotovorum* o *X.campestris* pv. *carotae*, la inoculación solo con *P. lilacinum* produjo no solo una disminución de la población del nematodo sino que produjo un aumento del peso seco y del contenido de clorofila (Nesha & Siddiqui, 2017). *P. lilacinum* cepa 251 (PL251), fue evaluado por Kiewnick & Sikora, (2006) para controlar el nematodo agallador en tomate. Estos autores realizaron la inoculación con conidios del hongo en suspensión acuosa antes de la siembra en el sustrato logrando una reducción en el número de masas de huevos en un 74 % y la

población final de nematodos en las raíces en un 71 % en comparación con el control inoculado. En este ensayo, la inoculación se realizó al transplante y con sustrato colonizado con el micelio del hongo logrando una reducción significativa del nematodo y una protección eficiente en la planta. En ambos casos de inoculación se necesitó una sola aplicación, independientemente del momento, para una reducción suficiente del nematodo demostrando la eficiencia de este hongo para el biocontrol del mismo. A su vez, la persistencia de *P. lilacinum* en el suelo una vez finalizado el ensayo fue corroborado por el cultivo de partículas de suelo. Similares resultados obtuvieron Rumbos *et al.* (2008), donde evaluaron ante la presencia de *Meloidogyne spp.*, la persistencia de *P. lilacinum* en suelos franco limosos, disminuyendo su persistencia con el agregado de arena y aumentando con el agregado de materia orgánica. En ambos casos, aunque variaba la densidad y el tiempo, se logró observar la persistencia del *P. lilacinum*. La persistencia de los microorganismos en el suelo depende de varias condiciones, tanto bióticas como abióticas. Entre otras se dependen del tipo de suelo, la humedad y condiciones del mismo (p.ej. salinidad), la competencia en la rizósfera con otros microorganismos así como también las prácticas realizadas habitualmente por productores que implican el uso de agroquímicos.

Como conclusión, se puede mencionar que los datos que se mostraron en este estudio, como los momentos de inoculación (antes, durante o después de la siembra), la reducción de la población de nematodos, la promoción del crecimiento vegetal y la persistencia de estos hongos en el suelo son útiles para diseñar estrategias de manejo para el control biológico de patógenos, principalmente de nematodos.

En este caso, si bien los dos hongos lograron reducir la población de nematodos, hubo un mayor daño en las raíces de los pimientos inoculados con *P. ostreatus*. Sin embargo, se merece un estudio adicional sobre los momentos de aplicación, ya que se puede sugerir que una inoculación pre-transplante puede dar tiempo al hongo a generar toxinas para reducir la población del nematodo en el suelo y disminuir el daño en la planta al momento del transplante.

*P. lilacinum* logró una disminución significativa del daño en las plantas tanto por acción directa controlando la población de *N. aberrans* como por acción indirecta logrando un aumento del crecimiento de las plántulas de pimiento. Es por este motivo que se seleccionó a este hongo para ensayos posteriores.

#### 4.6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for waterstress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Coolen, W. A. (1979). Methods for the extraction of *Meloidogyne spp.* and other nematodes from roots and soil. Pp. 317-330 in F. Lamberti and C.E. Taylor, eds. Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species) Systematics, Biology and Control. Academic Press, New York, NY, U.S.A.

Cristóbal, A. J., Cid del Prado, I., Marbán-Mendoza, N., Sánchez, G. P., Mora-Aguilera, G., & Manzanilla-López, R. H. (2001). Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. *Nematropica*, v. 31, p. 229-235.

Cronin, D., & Smith, S. (1979). A simple and rapid procedure for the analysis of reducing, total and individual sugars in potato. *Potato Research*, 22: 99-105.

Gortari, M. C., & Hours, R. A. (2019). In vitro antagonistic activity of Argentinean isolates of *Purpureocillium lilacinum* on *Nacobbus aberrans* eggs. *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)*, 9(1), 164-174.

Gunasekera, T., Holland, R., Gillings, M., Briscoe, D., Neethling, D., Williams, K., & Nevalainen, K. (2002). Phenotypic and genetic characterization of *Paecilomyces lilacinus* strains with biocontrol activity against root-knot nematodes. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 775–783.

Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.

Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of biological sciences*, 10(4), 273-290.

Hussey, R. S., & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.*, including a new technique. *Plant Disease Report*, 57, 1025-1028.

Inalbon, M. C., Mocchiutti, P., Zanuttini, M. A., Balatti, P. A., Rajchenberg, M., & Saparrat, M. C. (2015). Applying ligninolytic fungi on *Eucalyptus grandis* wood for pulping pretreatment or fractionation. *Procedia Materials Science*, 8, 1099-1107.

- Kiewnick, S., & Sikora, R. A. (2006a). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological control*, 38(2), 179-187.
- Kiewnick, S., & Sikora, R. A. (2006b). Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 for the biological control of the northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla* Chitwood. *Nematology*, 8(1), 69-78.
- Khun-in, A., Sukhakul, S., Chamswarnng, C., Tangkijchote, P., & Sasnarukkit, A. (2015). Culture filtrate of *Pleurotus ostreatus* isolate Poa3 effect on egg mass hatching and juvenile 2 of *Meloidogyne incognita* and its potential for biological control. *Journal of ISSAAS (International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences)*, 21(1), 46-54.
- Kwok, O. C. H., Plattner, R., Weisleder, D., & Wicklow, D. T. (1992). A nematocidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. *Journal of Chemical Ecology*, 18(2), 127-136.
- Luangsa-Ard, J., Houbraken, J., van Doorn, T., Hong, S. B., Borman, A. M., Hywel-Jones, N. L., & Samson, R. A. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS microbiology letters*, 321(2), 141-149.
- Lutts, S., Kinet, J. M., & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78(3), 389-398.
- Mukhtar, T., Arshad Hussain, M., & Zameer Kayani, M. (2013). Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra. *Phytopathologia Mediterranea*, 66-76.
- Nesha, R., & Siddiqui, Z. A. (2017). Effects of *Paecilomyces lilacinus* and *Aspergillus niger* alone and in combination on the growth, chlorophyll contents and soft rot disease complex of carrot. *Scientia Horticulturae*, 218, 258-264.
- Okorie, C. C., Ononuju, C. C., & Okwujiako, I. A. (2011). Management of *Meloidogyne incognita* with *Pleurotus ostreatus* and *P. tuberregium* in soybean. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(3).
- Oostenbrink, M. (1966). Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Major characteristics of the relation between nematodes and plants*, (66-4).
- Papaspyridi, L. M., Aligiannis, N., Christakopoulos, P., Skaltsounis, A. L., & Fokialakis, N. (2011). Production of bioactive metabolites with pharmaceutical and nutraceutical

interest by submerged fermentation of *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor. *Procedia Food Science*, 1, 1746-1752.

Roy, S., Barman, S., Chakraborty, U., & Chakraborty, B. (2015). Evaluation of Spent Mushroom Substrate as biofertilizer for growth improvement of *Capsicum annuum* L. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 3(3), 0-2.

Rumbos, C., Mendoza, A., Sikora, R., & Kiewnick, S. (2008). Persistence of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* strain 251 in soil under controlled conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 18(10), 1041-1050.

Sierra Monroy, J. A. (2002). Evaluación de la acción nematocida in vitro e in vivo de especies de *Pleurotus spp.*, sobre los nematodos *Meloidogyne spp.* y *Radopholus spp.* asociados a los cultivos de tomate y plátano. *Maestría Ciencias Agrarias*.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.

Sosa, A. L., Rosso, L. C., Salusso, F. A., Etcheverry, M. G., & Passone, M. A. (2018). Screening and identification of horticultural soil fungi for their evaluation against the plant parasitic nematode *Nacobbus aberrans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(5), 1-12.

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313.

Wille, C. N., Gomes, C. B., Minotto, E., & Nascimento, J. S. (2019). Potential of aqueous extracts of basidiomycetes to control root-knot nematodes on lettuce. *Horticultura Brasileira*, 37, 54-59.

## **Capítulo 5**

# **Rizobacterias con potencial antagonismo sobre *Nacobbus aberrans***

## 5.1- INTRODUCCIÓN

Este ensayo se centró en el uso de cepas de PGPR para el control de *N. aberrans*. Los mecanismos documentados por los cuales estos microorganismos pueden lograr un efectivo control de patógenos son la producción de antibióticos, quelantes de Fe (sideróforos), enzimas que degradan la pared celular (p. ej., quitinasa y glucanasa), producción de enzimas hidrolíticas y metabolitos nematocidas e inducción de resistencia sistémica (Subedi *et al.*, 2020).

En base a la bibliografía consultada sobre los distintos mecanismos de acción nematocida sobre otros nematodos fitófagos y el efecto promotor del crecimiento vegetal, que es otro mecanismo de protección frente a patógenos, es que se seleccionaron para el siguiente ensayo las siguientes rizobacterias:

- *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*: Produce un complejo de toxinas b-exotoxinas y d-endotoxinas que provocan la reducción en la eclosión de huevos, irreversibilidad de este efecto y necrosis. Los juveniles también son afectados por las toxinas, presentan vacuolización interna y deformaciones en el sistema digestivo (Bravo *et al.*, 2007). Diversos estudios confirmaron la efectividad de cepas de *B. thuringiensis* para el control de nematodos fitófagos (Mohammed *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2020).

- *Bacillus subtilis*: Este habitante predominante del suelo es ampliamente reconocido como un poderoso agente de biocontrol. Produce una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares que tienen propiedades larvicidas sobre huevos y quistes de nematodos. A su vez liberan endotoxinas que intervienen con el ciclo reproductivo de los nematodos, la eclosión de huevos y el crecimiento de juveniles (Reddy, 2012). *B. subtilis* fue estudiado para el control de especies formadoras de agallas y quistes como *Meloidogyne sp.* y *Heterodera sp.* afectando la reproducción del nematodo y por ende la reducción de la población (Abbasi *et al.*, 2013; Xiang *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2019).

- *Azospirillum brasilense*: Si bien no es una rizobacteria utilizada para el control de nematodos, hay estudios que afirman que afecta el patrón de metabolitos secundarios e induce resistencia a patógenos. Otros mecanismos descritos para esta bacteria para reducir el daño por patógenos, son la competencia, su desplazamiento e inhibición de la reproducción a través de la síntesis de sustancias tóxicas (Trinidad- Cruz *et al.*, 2019).

## 5.2- OBJETIVOS

1. Analizar el potencial de diferentes rizobacterias en el control del falso nematodo agallador.
2. Evaluar la respuesta a la inoculación con rizobacterias en plantas de pimiento crecidas en presencia de *N. aberrans*, utilizando parámetros bioquímicos, morfológicos y fisiológicos.

## 5.3- ENSAYO EXPERIMENTAL

### - Materiales y métodos:

#### Preparación del inóculo de bacterias

Se utilizaron inóculos comerciales de *Azospirillum brasilense* (Rizobacter) con una concentración inicial de  $1 \times 10^9$  UFC.ml<sup>-1</sup>, *Bacillus subtilis* (Sintesis Biológica, Argentina) con una concentración inicial de  $1 \times 10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup> y *Bacillus thuringiensis* (BAC-THUR, S. Ando y Cía.SA.) con una concentración inicial de  $1,7 \times 10^9$  UFC.ml<sup>-1</sup>. Para realizar la aplicación, los inóculos se llevaron a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup> en 50 ml.

### - Ensayo

El ensayo se llevó a cabo en el invernáculo del Instituto de Fisiología Vegetal de la UNLP en condiciones controladas durante los meses de agosto de 2018 y enero del 2019. Se sembraron semillas de pimiento Paco f1, previa desinfección con NaOCl (10 %) durante 5 minutos. En speedlings de 72 celdas con una mezcla de perlita-vermiculita (1:1) como sustrato, previamente autoclavado. Al cabo de 35 a 40 días aproximadamente se llevó a cabo el trasplante a macetas de 5 Kgs con una mezcla de tierra y arena (1:1) como sustrato, previamente tinalizado. Al momento del trasplante se inoculó con una solución acuosa que contenían 5000 huevos de *N. aberrans*; tres días después del trasplante (DDT) se inoculó con cada una de las diferentes bacterias al cuello de la planta y luego cada quince días hasta finalizar el ensayo (Imagen 5.1).

Los tratamientos fueron:

(a) plantas de pimiento sin *N. aberrans* (N0):

1- plantas sin rizobacterias (NI),

2- plantas inoculadas con *Azospirillum brasilense* (AB)

3- plantas inoculadas con *Bacillus subtilis* (BS)

4- plantas inoculadas con *Bacillus thuringiensis* (BT);

b) plantas de pimiento con *N. aberrans* (N1):

1- plantas sin rizobacterias (NI),

2- plantas inoculadas con *Azospirillum brasilense* (AB),

3- plantas inoculadas con *Bacillus subtilis* (BS),

4- plantas inoculadas con *Bacillus thuringiensis* (BT).



**Imagen 5.1:** Plantas de pimiento inoculadas y no inoculadas con rizobacterias en presencia y ausencia de *N. aberrans* (Imagen propia).

Semanalmente se midió la altura y el diámetro del tallo. Una vez finalizado el ensayo, a los 120 días después del trasplante (DDT), se realizó un muestreo de la parte aérea y de la raíz. Se analizaron los resultados en 3 grupos: indicadores de la población del nematodo; parámetros de crecimiento, e indicadores de estrés en las plantas (explicados en el capítulo 2).

#### Indicadores de población de nematodos:

- Número de huevos de nematodos de las raíces extraídos mediante el método de Hussey & Barker (1973), y separados y purificados por el método de Coolen (1979).
- Factor de reproducción del nematodo (Oostenbrink, 1966).

#### Determinación de parámetros fisiológicos y de crecimiento

- Contenido de clorofila y carotenos según el método de Wellburn (1994).
- Contenido de proteínas solubles mediante el método de Bradford (1976).
- Fotosíntesis neta (PN), Transpiración (E), conductancia estomática (G) y Eficiencia en el uso del agua (EUA).

#### Determinación de parámetros de estrés

- Contenido de prolina mediante el método de Bates *et al.* (1973).
- Contenido de Azúcares totales y reductores mediante el método de Cronin & Smith (1979).
- Contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Singleton & Rossi, (1965), con modificaciones.
- Conductividad relativa de las membranas celulares de hojas y raíces mediante el método de Lutts *et al.* (1996).
- Contenido de MDA mediante el método de Heath & Packer (1968).

#### Diseño experimental

El ensayo se realizó con un diseño completamente al azar, en un esquema factorial 4 x 2, de cuatro condiciones de rizobacterias (NI, AB, BS, BT) y dos condiciones de infección del suelo (sustrato N0, N1). En total, se realizaron 10 repeticiones por tratamiento, cada una de las cuales comprende una planta. Los resultados se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y los valores medios se compararon mediante LSD a un nivel de significancia de 0,05 utilizando el programa estadístico SISVAR 2018.

#### **5.4- RESULTADOS:**

Los tratamientos con *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* bajaron notablemente la población de *N. aberrans*, mientras que las plantas inoculadas con *Azospirillum brasilense* fueron muy variables en cuanto al número de huevos del nematodo (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1:** Número de huevos totales y Factor de reproducción (Fr) de las plantas de pimiento tratadas con *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus subtilis* (BS) y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) en presencia de *N. aberrans*.

Tratamiento	N° de Huevos totales	Fr
NI	62375 a	12,46 a
AB	26716 bc	5,34 a
BS	10440 c	2,09 b
BT	4380 d	0,88 c

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre rizobacterias.

Los parámetros de crecimiento evidenciaron un aumento de la altura final en las plantas tratadas con las bacterias tanto en presencia como en ausencia del nematodo. En cuanto al diámetro del tallo se pudo observar que las plantas tratadas con BT obtuvieron mayor calibre con respecto a los otros tratamientos tanto en ausencia como en presencia del nematodo (Tabla 5.2). En ausencia del nematodo, las rizobacterias aumentaron tanto el peso fresco como el peso seco de las plantas comparadas con las plantas control. En presencia del nematodo, todas las plantas redujeron el peso seco significativamente. Sin embargo BT y BS obtuvieron los mayores valores de peso seco (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2:** Altura, diámetro del tallo, peso fresco y peso seco de las plantas de pimiento tratadas con *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus subtilis* (BS) y *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (BT) en presencia (N1) y ausencia (N0) de *N. aberrans*.

<i>N. aberrans</i>	Tratamientos	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Peso fresco total (g)	Peso seco total(g)
N0	NI	38,13 Ba	8,40 Ba	289,00 Ba	46,00 Ba
	AB	39,90 Bb	8,82 Bb	384,24 Aa	52,83 Ba
	BS	45,80 Aa	9,69 Aa	386,39 Aa	61,60 Aa
	BT	41,40 Ba	10,08 Aa	395,56 Aa	62,67 Aa
N1	NI	36,00 Ca	9,83 Aa	290,28 Ba	38,90 ABb
	AB	44,50 Aa	10,61 Aa	291,24 Bb	37,96 Bb
	BS	43,30 ABa	9,63 Aa	331,60 Aa	44,78 ABb

BT                    40,30 Ba                    10,0 Aa                    365,47 Aa                    48,56 Ab

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre bacterias para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

Las plantas en presencia del nematodo disminuyeron su capacidad fotosintética, la conductancia estomática y la eficiencia en el uso del agua, como se observa en la tabla 5.3. La inoculación con las bacterias evitó que la infección con el nematodo disminuyera en gran medida la PN de las plantas, destacándose la respuesta de *B. thuringiensis*. En cuanto a E, disminuyó en las plantas en presencia de *N. aberrans* pero sin inocular con las bacterias ( $p < 0,05$ ). La conductancia estomática disminuyó en las plantas infectadas por *N. aberrans*. Al relacionar la PN con la E se pudo determinar la Eficiencia en el uso de agua (EUA) mostrando que la EUA disminuyó en aquellos tratamientos en presencia del nematodo a excepción de BT (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3:** Fotosíntesis neta (PN), transpiración (E), conductancia estomática (G) y eficiencia en el uso de agua (EUA) de las plantas de pimiento tratadas con *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus subtilis* (BS) y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) en presencia (N1) y ausencia (N0) de *N. aberrans*.

<i>N. aberrans</i>	Tratamientos	PN	E	G	EUA
		( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	( $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ )
N0	NI	18,35 Aa	1,95 Aa	69,23 Aa	9,59 Aa
	AB	15,05 Ba	1,90 Aa	72,53 Aa	7,93 Aa
	BS	11,10 Ca	2,50 Aa	60,73 Ba	4,51 Ba
	BT	13,55 Ba	1,50 Aa	49,80 Ca	9,21 Aa
N1	NI	7,80 Bb	1,55 Bb	40,60 Bb	5,03 Bb
	AB	8,40 Ab	1,75 Aa	49,77 Ab	4,84 Bb
	BS	9,90 Aa	2,05 Aa	45,00 Ab	5,00 Ba
	BT	15,45 Aa	1,46 Aa	51,57 Aa	10,72 Aa

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre bacterias para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

Tanto el contenido de clorofila, carotenos y proteínas solubles en hojas, disminuyeron en presencia del nematodo (Tabla 5.4.). En las plantas inoculadas con bacterias, tanto en presencia como en ausencia de nematodos, los contenidos de estos parámetros fueron altos. Las proteínas en raíces no mostraron diferencias significativas entre tratamientos en ausencia del nematodo. En presencia del nematodo hubo diferencias con AB que fue el tratamiento con menor contenido de pigmentos fotosintéticos (Tabla 5.4).

**Tabla 5.4:** Contenido de clorofila, carotenos y proteínas solubles en hojas y raíces de las plantas de pimiento tratadas con *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus subtilis* (BS) y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) en presencia (N1) y ausencia (N0) de *N. aberrans*.

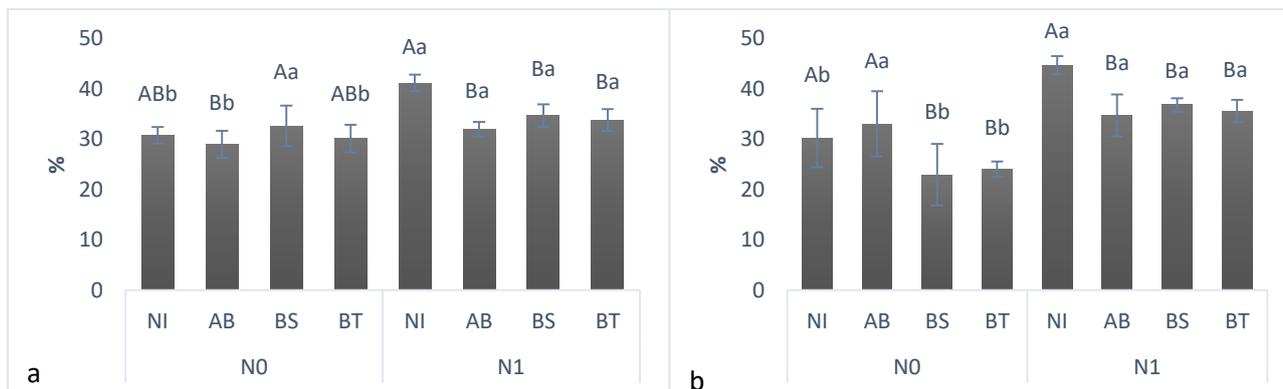
<i>N. aberrans</i>	Tratamientos	Clorofila ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	Carotenos ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	Proteínas de hojas ( $\mu\text{l}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	Proteínas de raíces ( $\mu\text{l}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
N0	NI	89,07 Aa	12,72 Aa	24,97 Aa	2,15 Aa
	AB	78,74 Ba	12,05 Aa	22,02 BCa	2,12 Aa
	BE	81,75 Ba	12,04 Aa	20,56 Cb	1,92 Ab
	BT	81,06 Ba	11,97 Aa	23,66 ABa	1,87 Ab
N1	NI	69,37 Bb	10,61 Bb	15,08 Bb	2,37 Aa
	AB	82,44 Aa	12,25 Aa	20,02 Aa	1,79 Ba
	BS	82,35 Aa	12,15 Aa	23,24 Ab	2,26 Aa
	BT	81,18 Aa	12,31 Aa	22,31 Ab	2,55 Aa

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre bacterias para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).



**Imagen 5.2-** a- Plantas de pimiento sin inocular (NI) en presencia de *N. aberrans* (N1). b- Planta de pimiento sin inocular (NI) en presencia (N1) y ausencia (N0) de *N. aberrans* (Imagen propia).

La conductividad relativa de las membranas celulares tanto en hojas como en raíces aumentó en presencia del nematodo, aunque se vió atenuado en las plantas inoculadas con las bacterias (Figura 5.1a y b).

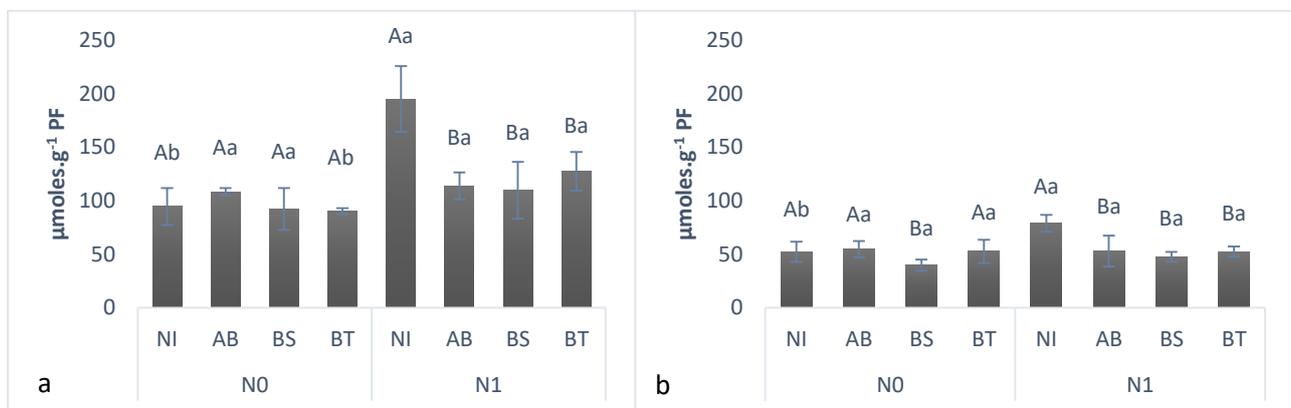


**Figura 5.1:** Conductividad relativa de membranas de hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con las bacterias: *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus subtilis* (BS) y *Bacillus thuringiensis var Kurstaki* (BT); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre bacterias para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

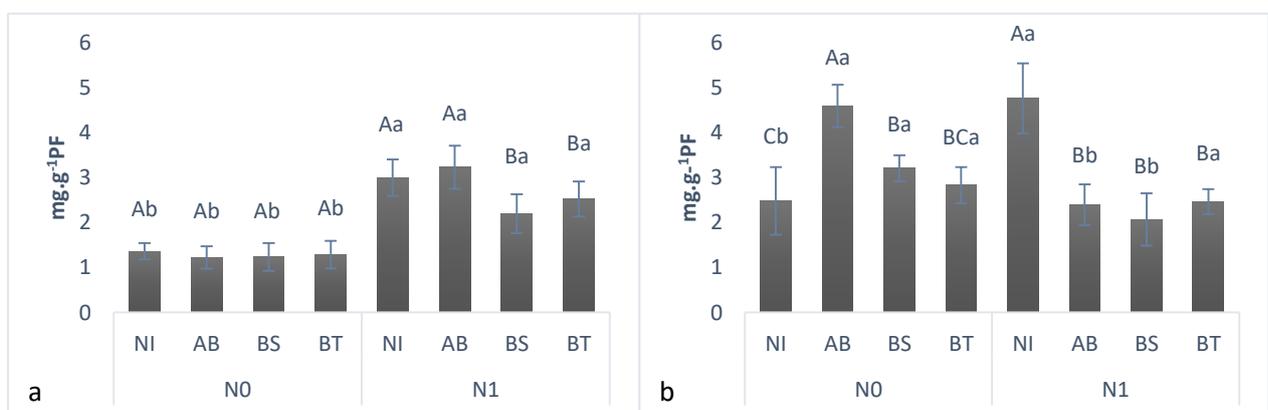
Se acumuló menor contenido de prolina y azúcares totales en aquellos tratamientos inoculados con rizobacterias en presencia del nematodo y en los tratamientos en

ausencia del nematodo. En presencia del nematodo, BS y BT acumularon menor contenido de azúcares totales en hojas y raíces. En el tratamiento AB se acumuló azúcares totales en mayor proporción con respecto a los otros tratamientos en hojas en presencia del nematodo (Figuras 5.2 y 5.3). También se observaron diferencias entre hojas y raíces en estos osmolitos. Fue mayor el contenido de prolina en hojas que en raíces (Figura 5.2a y b). La misma tendencia se observó con el contenido de azúcares reductores (Figuras 5.4a y b). En cambio, el contenido de azúcares totales fue mayor en las raíces que en las hojas (Figuras 5.3a y b).



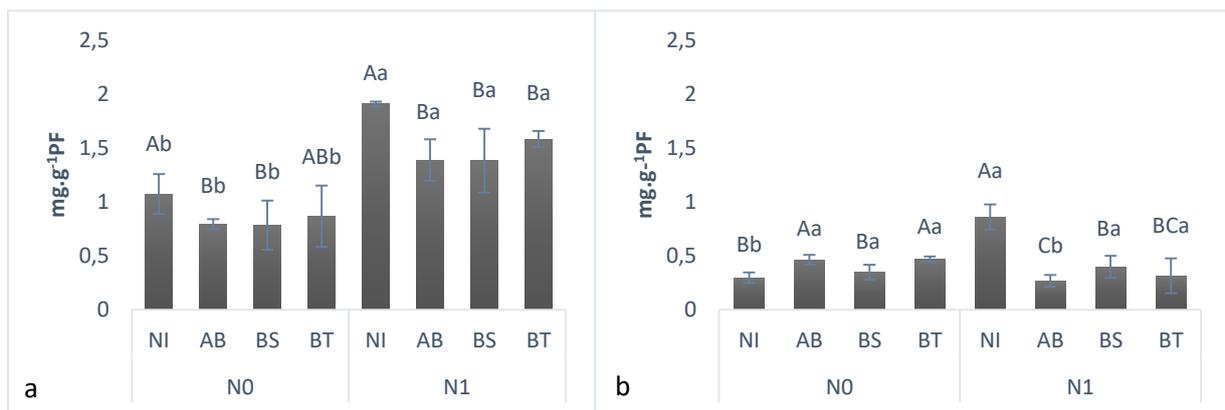
**Figura 5.2:** Contenido de prolina en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con las bacterias: *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus subtilis* (BS) y *Bacillus thuringiensis var Kurstaki* (BT); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre bacterias para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.3:** Contenido de azúcares totales en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con las bacterias: *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus subtilis* (BS) y *Bacillus thuringiensis var Kurstaki* (BT); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

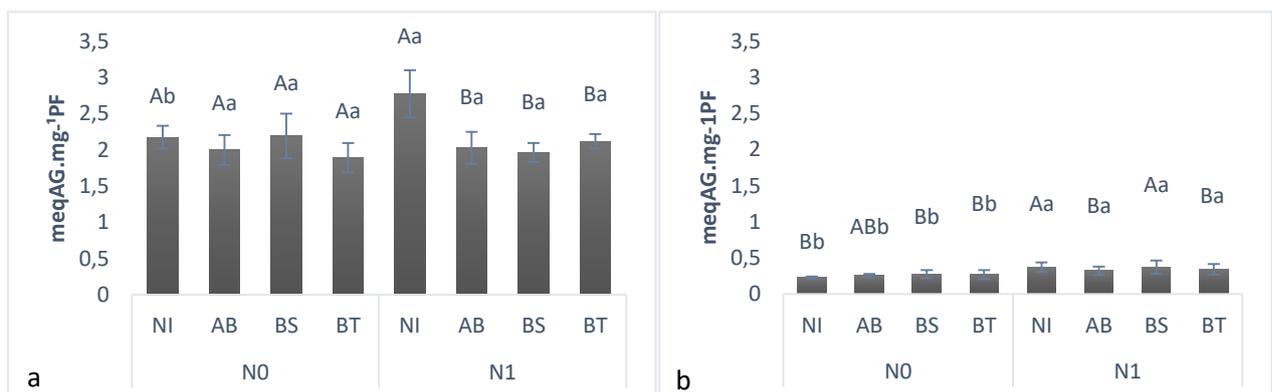
Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre bacterias para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.4:** Contenido de azúcares reductores en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con las bacterias: *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus subtilis* (BS) y *Bacillus thuringiensis var Kurstaki* (BT); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre bacterias para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

En cuanto al contenido de compuestos fenólicos, en hojas se observó una mayor acumulación en las plantas infectadas por nematodos y sin inoculación con bacterias (Figuras 5.5a).



**Figura 5.5:** Contenido de compuestos fenólicos en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con las bacterias: *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus subtilis* (BS) y *Bacillus thuringiensis var Kurstaki* (BT); en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre bacterias para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

Tanto en los tratamientos en ausencia y presencia de nematodos e inoculadas con rizobacterias mostraron una menor acumulación comparadas con el tratamiento NI en presencia del nematodo (Figura 5.5a). En raíces, los tratamientos inoculados con rizobacterias y *N. aberrans* mostraron mayor acumulación de compuestos fenólicos al igual que el tratamiento NI. En ausencia del nematodo, los valores fueron bajos (Figura 5.5b).

## 5.5- DISCUSIÓN

Dentro de los microorganismos con potencial nematocida que habitan el suelo se encuentran las rizobacterias. Estos agentes de control estimulan el crecimiento y la nutrición de las plantas. Existen muchos estudios de estos microorganismos como agentes de control de patógenos a través de exudados o de la inducción de resistencia sistémica en la planta (Reddy, 2012). Si bien las investigaciones sobre el efecto que pueden tener sobre *N. aberrans* son escasas, hay trabajos en donde se estudió la actividad nematocida sobre otros nematodos de similares características (Marquez *et al.*, 2007; Almaghrabi *et al.*, 2013; Viljoen *et al.*, 2017; Xiang *et al.*, 2017). En este ensayo se pudo observar que algunas de las rizobacterias ensayadas, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, disminuyeron la infección de las raíces de pimiento por *N. aberrans*. Esto pudo deberse a que las rizobacterias liberan antibióticos y otros metabolitos con propiedades nematocidas como quitinasas y enzimas proteolíticas (*B. subtilis*) o tóxicas (*B. thuringiensis*) (Subedi *et al.*, 2020). Similares resultados se observaron al inocular *B. subtilis* en cultivos de pepino, tomate y berenjena logrando reducir la población y la tasa de reproducción de *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javánica* (Abbasi *et al.*, 2013; Sohrabi *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2020). En plantas de tomate inoculadas con *B. thuringiensis*, se observó una reducción en la infección de raíces por parte de *M.*

*incognita* (Mohammed *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2020). Los parámetros de crecimiento determinados mostraron una tendencia al aumento en los tratamientos inoculados por las rizobacterias. La promoción directa del crecimiento de las plantas por acción de las PGPR generalmente implica la provisión de compuestos hormonales como auxinas, giberelinas y citoquininas o facilitando la captación de nutrientes del medio ambiente (Reddy, 2012). En plantas de soja y tomate inoculadas con rizobacterias del género *Bacillus* se registró un aumento de la altura, biomasa y rendimiento frente al ataque de *Heterodera glycines* y *M. incognita* respectivamente (Almaghrabi *et al.*, 2013; Xiang *et al.*, 2017). En este estudio los resultados mostraron una reducción de los pigmentos vegetales y de las proteínas solubles en las plantas inoculadas con *N. aberrans*. Dichos efectos son comunes en plantas infectadas con nematodos formadores de agallas, diversos trabajos mostraron una reducción de la clorofila total y de carotenos en plantas infectadas con especies de *Meloidogyne sp.* (Banora & Almaghrabi 2019; Galvez *et al.* 2019; Khanna *et al.*, 2019a). Al estar las plantas de pimiento inoculadas con las rizobacterias se pudo observar un aumento de estos pigmentos fotosintéticos y de las proteínas solubles en hojas al igual que lo observado por Khanna *et al.* (2019b) en plantas de tomate inoculadas con rizobacterias en presencia de *M. incognita*.

Según se observó en este ensayo, en las plantas infestadas por el nematodo hubo una reducción en la tasa de transpiración, conductancia estomática y fotosíntesis neta. Plantas de tomate, pimiento y café en presencia de *Meloidogyne sp.* tuvieron una reducción de estos parámetros fisiológicos (Mioranza *et al.*, 2018; Galvez *et al.*, 2019; Goulart *et al.*, 2019). Sin embargo, estos parámetros no se vieron afectados en las plantas tratadas con *B. thuringiensis*, lo que condujo a una mejor eficiencia en el uso del agua en las plantas de ese tratamiento. Khanna *et al.* (2019a) obtuvieron una mejora de la tasa de transpiración y fotosíntesis neta al aplicar rizobacterias en plantas de tomate en presencia de *M. incognita*.

Como se mencionó en capítulos anteriores la conductividad relativa mide la liberación de electrolitos de las membranas celulares. En situaciones de estrés biótico o abiótico se produce un daño en las membranas provocando una mayor liberación de electrolitos hacia el exterior (Beltrano *et al.*, 2013). Los resultados de este ensayo mostraron un aumento de la conductividad relativa en las plantas infectadas por el nematodo pero en aquellos tratamientos inoculados con rizobacterias la conductividad fue menor.

También se observó que los niveles de osmoprotectores como azúcares totales, azúcares reductores y prolina fueron estimulados en las plantas de pimiento bajo la influencia de los nematodos. Dichos parámetros mostraron una baja acumulación en los

tratamientos inoculados con las rizobacterias en presencia de nematodos. Diferente fue el caso de Khanna *et al.* (2019b) quienes informaron que estos parámetros mostraron mayor acumulación en plantas de tomate en presencia de *M. incognita* e inoculados con *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia gladioli*, lo que evidencia un efecto diferente al observado en este experimento.

Se observó una acumulación de compuestos fenólicos en las raíces de las plantas infestadas con *N. aberrans* comparadas con las plantas control y la acumulación de estos compuestos fue mayor en las plantas tratadas con rizobacterias en presencia de nematodos respecto al tratamiento control. El aumento en el contenido fenólico total de plantas de berenjena infectadas con nematodos se atribuyó a la estimulación de la actividad de la polifenol oxidasa (Nayak, 2015). También puede relacionarse con la deposición de fenol en las paredes celulares de los tejidos vegetales que dificulta la entrada de nematodos en la raíz (Khanna *et al.*, 2019a). La estimulación en los niveles de ácidos fenólicos también se registró en *Pisum sativum* bajo la influencia de *M. incognita* en presencia de *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* y *P. fluorescens* (Abd-el-Khair *et al.*, 2019) y en plantas de tomates inoculadas con *Pseudomonas jessenii* y *Pseudomonas synxantha*, en presencia de *M. incognita* (Sharma & Sharma 2017).

Las rizobacterias tienen potencialidad para el control de *N. aberrans*, lo que las hace una herramienta factible de ser utilizada para aumentar la producción y en la sanidad de los cultivos en una agricultura sustentable. No solo se las puede utilizar para promover el crecimiento vegetal, sino también como biocontroladores de patógenos.

Para concluir, en este estudio las rizobacterias *B. subtilis* y *B. thuringiensis* morigeraron el daño provocado por *N. aberrans* en las plantas. Disminuyeron la población considerablemente con respecto al tratamiento NI y tuvieron menos variabilidad que *A. brasilense*. En base a los resultados, ambas especies de *Bacillus* son prometedores para el control de *N. aberrans*, pero en base a ciertos parámetros de crecimiento y de estrés se seleccionó a *B. thuringiensis* para los siguientes ensayos.

## 5.6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi, M. W., Zaki, M. J., & Anis, M. (2013). Application of *Bacillus* species cultured on different low cost organic substrates for the control of root-knot nematode infection on okra (*Abelmoschus esculentus* Moench). *Pak. J. Bot.*, 45(3), 1079-1084.

Abd-El-Khair, H., El-Nagdi, W., Youssef, M., Abd-Elgawad, M. M., & Dawood, M. G. (2019). Protective effect of *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, and *Pseudomonas fluorescens*

isolates against root knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-7.

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.

Banora, M. Y., & Almaghrabi, O. A. A. (2019). Differential response of some nematode-resistant and susceptible tomato genotypes to *Meloidogyne javanica* infection. *Journal of Plant Protection Research*, 59(1).

Bates, L. S., Waldren, R. P., & Tease, I. D. (1973). Rapid determination of the proline for stress studies. *Plant Soil*, 85: 107-129.

Beltrano, J., Ruscitti, M., Arango, M. C., & Ronco, M. (2013). Effects of arbuscular mycorrhiza inoculation on plant growth, biological and physiological parameters and mineral nutrition in pepper grown under different salinity and p levels. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(1), 123-141.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Bravo, A., Gill, S. S., & Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435.

Cao, S., Li, D., Ma, X., Xin, Q., Song, J., Lu, F., & Li, Y. (2019). A novel unhairing enzyme produced by heterologous expression of keratinase gene (kerT) in *Bacillus subtilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(8), 1-10.

Choi, T. G., Maung, C. E. H., Lee, D. R., Henry, A. B., Lee, Y. S., & Kim, K. Y. (2020). Role of bacterial antagonists of fungal pathogens, *Bacillus thuringiensis* KYC and *Bacillus velezensis* CE 100 in control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* and subsequent growth promotion of tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 30(7), 685-700.

Coolen, W. A. (1979). Methods for the extraction of *Meloidogyne spp.* and other nematodes from roots and soil. Pp. 317-330 in F. Lamberti and C.E. Taylor, eds. Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species) Systematics, Biology and Control. Academic Press, New York, NY, U.S.A.

- Cronin, D., & Smith, S. (1979). A simple and rapid procedure for the analysis of reducing, total and individual sugars in potato. *Potato Research*, 22: 99-105.
- Gálvez, A., del Amor, F. M., Ros, C., & López-Marín, J. (2019). New traits to identify physiological responses induced by different rootstocks after root-knot nematode inoculation (*Meloidogyne incognita*) in sweet pepper. *Crop Protection*, 119, 126-133.
- Goulart, R. D. R., Terra, W. C., Sônia, M. D. L., Alves, J. D., Campos, V. P., Fatobene, B. J. D. R., & Rosângela, D. A. D. L. (2019). *Meloidogyne paranaensis* and *M. exigua* alter coffee physiology. *Nematology*, 21(5), 459-467.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
- Hussey, R. S., & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.*, including a new technique. *Plant Disease Report*, v. 57, p. 1025-1028
- Khanna, K., Jamwal, V. L., Kohli, S. K., Gandhi, S. G., Ohri, P., Bhardwaj, R., & Ahmad, P. (2019a). Role of plant growth promoting Bacteria (PGPRs) as biocontrol agents of *Meloidogyne incognita* through improved plant defense of *Lycopersicon esculentum*. *Plant and soil*, 436(1), 325-345.
- Khanna, K., Sharma, A., Ohri, P., Bhardwaj, R., Abd\_Allah, E. F., Hashem, A., & Ahmad, P. (2019b). Impact of plant growth promoting rhizobacteria in the orchestration of *Lycopersicon esculentum* Mill. resistance to plant parasitic nematodes: a metabolomic approach to evaluate defense responses under field conditions. *Biomolecules*, 9(11), 676.
- Luo, Y., & Helmann, J. D. (2012). Analysis of the role of *Bacillus subtilis*  $\sigma^M$  in  $\beta$ -lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. *Molecular microbiology*, 83(3), 623-639.
- Lutts, S., Kinet, J. M., & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78(3), 389-398.
- Márquez, M. E., Garmendía, L., González, E. F., & Escobar, M. (2007). Cepas de *Bacillus Thuriengiensis* con actividad biológica contra *Meloidogyne incognita*. *Fitosanidad*, 11(1), 31-35.

- Mioranza, T. M., Inagaki, A. M., Muller, M. A., Stangarlin, J. R., Guimarães, V. F., Klein, J., & Kuhn, O. J. (2018). Gas exchange and photosynthetic light response curves in nematode-infected tomato plants treated with *Thuja occidentalis*. *Australian Journal of Crop Science*, 12(4), 583-591.
- Mohammed, S. H., El Saedy, M. A., Enan, M. R., Ibrahim, N. E., Ghareeb, A., & Moustafa, S. A. (2008). Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J. Cell Mol. Biol*, 7(1), 57-66.
- Nayak, D. K. (2015). Effects of nematode infection on contents of phenolic substances as influenced by root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in susceptible and resistant brinjal cultivars. *Agricultural Science Digest-A Research Journal*, 35(2), 163-164.
- Oostenbrink, M. (1966). Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Major characteristics of the relation between nematodes and plants*, (66-4).
- Reddy, P. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In *Recent advances in crop protection* (pp. 131-158). Springer, New Delhi.
- Sharma, I. P., & Sharma, A. K. (2017). Co-inoculation of tomato with an arbuscular mycorrhizal fungus improves plant immunity and reduces root-knot nematode infection. *Rhizosphere*, 4, 25–28.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.
- Sohrabi, F., Sheikholeslami, M., Heydari, R., Rezaee, S., & Sharifi, R. (2018). Evaluation of four rhizobacteria on tomato growth and suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* under greenhouse conditions, a pilot study. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 1-5.
- Subedi, P., Gattoni, K., Liu, W., Lawrence, K. S., & Park, S. W. (2020). Current utility of plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents towards plant-parasitic nematodes. *Plants*, 9(9), 1167.
- Trinidad-Cruz, J. R., Rincón-Enríquez, G., Quiñones-Aguilar, E. E., Arce-Leal, Á. P., & Leyva-López, N. E. (2019). Inductores de resistencia vegetal en el control de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles de limón (*Citrus aurantifolia*) mexicano. *Revista mexicana de fitopatología*, 37(2), 304-317.

Viljoen, A., Mahuku, G. S., Massawe, C., Tendo Ssali, R., Kimunye, J. N., Mostert, G., & Coyne, D. L. (2017). Banana diseases and pests: Field guide for diagnostics and data collection.

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls A and B, as well as Total caroteinds, using various solvents with Spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307-313.

Xiang, N., Lawrence, K. S., Kloepper, J. W., Donald, P. A., & McInroy, J. A. (2017). Biological control of *Heterodera glycines* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on soybean. *PloS one*, 12(7), e0181201.

## **Capítulo 6**

### **Interacciones de microorganismos para el control biológico de *Nacobbus aberrans*.**

## 6.1- INTRODUCCIÓN

En base a los resultados analizados en capítulos anteriores y a que los agentes de biocontrol tienen que ser compatibles con las estrategias de manejo integrado de plagas, es que se seleccionó una micorriza, un hongo nematófago y una rizobacteria para evaluar su inoculación en plantas de pimiento de manera combinada frente al ataque de *N. aberrans*. El hongo micorrizico seleccionado fue *Rhizophagus intraradices* B1 debido a que tuvo un efectivo control de la población de nematodos y atenuación del estrés provocados por éstos. Si bien la infestación por nematodos afectó el % de micorrización y de viabilidad de las estructuras fúngicas, no se vieron afectadas las funciones de protección. El hongo nematófago *Purpureocillium lilacinum* no solo benefició el crecimiento de las raíces de las plantas inoculadas frente al ataque de *N. aberrans* sino también produjo una reducción en el número de huevos de las raíces. A su vez la persistencia del hongo durante el ciclo del cultivo no se vio afectado por los nematodos, encontrándose en el suelo una vez finalizado el ensayo. La bacteria seleccionada fue *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*. Esta bacteria logró disminuir significativamente la población de *N. aberrans* y logró una mejora en el crecimiento, tanto en ausencia como en presencia del nematodo. Esto llevó a que los parámetros medidos mostraran una atenuación importante del estrés causado por *N. aberrans*. Existen referencias bibliográficas que indican sobre los beneficios de emplear consorcios de microorganismos para mejorar el crecimiento vegetal, y para hacerle frente a patógenos y otras situaciones de estrés (Siddiqui, 2008; Liu *et al.*, 2012; Sharma & Sharma, 2017). La inoculación con estos microorganismos se evaluó en distintos momentos del cultivo con la finalidad de lograr el ataque al patógeno en distintos momentos del ciclo (huevo, larva, adultos). En el caso de los nematodos es necesario no sólo conocer su ciclo sino también la duración del mismo, la adaptación al medio y los componentes de la cutícula de los distintos estadios así como los distintos mecanismos de acción de los microorganismos de acción para un eficiente control. En este estudio se inoculó el hongo MA a la siembra logrando el establecimiento temprano y permitiéndole competir contra los juveniles (J2) por el espacio y los nutrientes (Barea *et al.*, 2005). A su vez la proliferación de las hifas le permitió a la planta compensar el daño a las raíces producido por las agallas, siendo de utilidad para la absorción de agua y nutrientes (Azcon-Aguilar & Barea, 1996). Otro mecanismo de acción por el cual las micorrizas ejercen una actividad protectora de las plantas es con los exudados, que no solo afectan la motilidad de los nematodos sino que se ha documentado que estimula el crecimiento de otros microorganismos benéficos en la rizosfera como las PGPR (Reddy, 2012; Vos *et al.*, 2012). El hongo nematófago fue inoculado al trasplante mediante sustrato con micelio,

pudiendo ser factible de inocular en otros estadíos debido a que tiene la capacidad de parasitar huevos, juveniles y hembras de nematodos agalladores (Sosa *et al.*, 2018; Gortari & Hours, 2019). Y por último las bacterias fueron inoculadas una semana después del trasplante al cuello de la planta y luego cada 15 días. *B. thuringiensis* además de ser una PGPR, tiene la capacidad de producir un complejo de toxinas b-exotoxinas y d-endotoxinas que afectan huevos y juveniles de nematodos atacando su sistema digestivo (Bravo *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que las inoculaciones fueron efectivas en los momentos que se evaluaron en los distintos ensayos es que se utilizaron los mismos métodos de inoculación en este ensayo final combinando los microorganismos. Este capítulo se limitará al estudio de las interacciones entre los microorganismos antagonistas de nematodos, de modo de verificar si hay mutualismo, comensalismo, sinergismo o nula interacción entre los microorganismos benéficos para el control de nematodos y protección de las plantas de pimiento.

## 6.2- OBJETIVOS

Analizar si la combinación de los microorganismos previamente estudiados y seleccionados reduce el parasitismo de *N. aberrans* en plantas de pimiento y determinar los posibles mecanismos de interacción.

## 6.3- ENSAYO EXPERIMENTAL

### - Materiales y métodos:

En este ensayo se inocularon las plantas de pimiento con los microorganismos seleccionados, tanto individualmente como combinados. Como se mencionó en los capítulos anteriores se utilizó el hongo micorrícico *Rhizophagus intraradices* B1 (RI B1), el hongo nematófago *Purpureocillium lilacinum* LPSC# 876 y la rizobacteria *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BAC-THUR, S. Ando y Cía.SA.) con una concentración inicial de  $1,7 \times 10^9$  UFC.ml<sup>-1</sup>.

### - Ensayo

El ensayo se llevó a cabo en el invernáculo del Instituto de Fisiología Vegetal de la UNLP en condiciones controladas entre los meses de septiembre del 2019 y enero de 2020. Se sembraron semillas de pimiento Fyuco, previa desinfección con NaOCl (10 %)

durante 5 minutos en speedlings de 72 celdas. Se utilizó como sustrato una mezcla de inoculo micorrizico para los tratamientos con RI B1 y para los tratamientos sin micorrizas inoculo inactivado por autoclave, y una mezcla compuesta por perlita:vermiculita (1:1) previamente autoclavada. Al cabo de 35 a 40 días aproximadamente se llevó a cabo el trasplante a macetas de 5 Kgs con una mezcla de tierra y arena (1:1), previamente tinalizada. Al momento del trasplante se inoculó con sustrato colonizado por el micelio de *P. lilacinum* en un volumen de 100 cm<sup>3</sup> por maceta; la solución con los huevos de nematodos, 5000/ml, se inoculó al día siguiente del trasplante; y la bacteria a los siete después del trasplante utilizando una concentración de 1x10<sup>7</sup> en 50 ml de agua destilada aplicada al cuello de la planta y luego cada quince días hasta finalizar el ensayo (Imagen 6.1).



**Imagen 6.1-** Plantas de pimiento inoculadas de forma individual y combinada con RI B1, PL y BT en ausencia y presencia de *N. aberrans* (Imagen propia).

Luego de las inoculaciones ya explicadas los tratamientos establecidos fueron:

(a) plantas de pimiento sin *N. aberrans* (N0):

- 1- plantas sin microorganismos (NI),
- 2- plantas inoculadas con RI B1 (B1)
- 3- plantas inoculadas con *P. lilacinum* (PL)
- 4- plantas inoculadas con *Bacillus thuringiensis* (BT);
- 5- plantas inoculadas con RI B1 y *P. lilacinum* (B1PL)
- 6- plantas inoculadas con RI B1 y *B. thuringiensis* (B1BT)

7- plantas inoculadas con *P. lilacinum* y *B. thuringiensis* (PLBT)

8- plantas inoculadas con RI B1, *P. lilacinum* y *B. thuringiensis* (B1PLBT)

b) plantas de pimiento con *N. aberrans* (N1):

1- plantas sin microorganismos (NI),

2- plantas inoculadas con RI B1 (B1)

3- plantas inoculadas con *P. lilacinum* (PL)

4- plantas inoculadas con *Bacillus thuringiensis* (BT);

5- plantas inoculadas con RI B1 y *P. lilacinum* (B1PL)

6- plantas inoculadas con RI B1 y *B. thuringiensis* (B1BT)

7- plantas inoculadas con *P. lilacinum* y *B. thuringiensis* (PLBT)

8- plantas inoculadas con RI B1, *P. lilacinum* y *B. thuringiensis* (B1PLBT)

Semanalmente se midió la altura, el diámetro del tallo y cada 20 días se midió la conductancia estomática con porómetro Decagon SC-1. Una vez finalizado el ensayo, a los 120 DDT, se realizó un muestreo de la parte aérea y de la raíz para la determinación de los siguientes parámetros (explicados en capítulos anteriores):

#### Indicadores de población de nematodos:

- Cantidad de huevos de nematodos extraídos de las raíces mediante el método de Hussey & Barker (1973). Separados y purificados por el método de Coolen (1979).
- Factor de reproducción del nematodo (Oostenbrink, 1966).

#### Determinación de parámetros fisiológicos y de crecimiento en pimiento

- Peso fresco y peso seco
- Contenido de clorofila según el método de Wellburn (1994).
- Contenido de proteínas solubles mediante el método de Bradford (1976).
- Rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII).

Para medir el rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII) se empleó un medidor de fluorescencia modulada de la clorofila Fluorímetro FMS2, Hansatech, utilizando el método del pulso saturante (Tambussi & Graciano, 2010). Se eligieron 10 plantas de cada tratamiento y sobre hojas totalmente expandidas y no senescentes se le colocaron

pinzas (“clips”) especiales, provistas por el fabricante del equipo, que permiten oscurecer un sector de la hoja a medir por 30 minutos a modo de aclimatar a la oscuridad y relajar los 15 mecanismos de disipación no fotoquímica. El coeficiente  $F_v/F_m$  puede tomar valores entre 0 y 0,85 y connota una relación directa con el porcentaje de centros funcionales del fotosistema II.

- Tasa de transporte de electrones (ETR, Electron transport rates)

Este parámetro representa una estimación del tránsito de electrones a través de la cadena de transporte fotosintético. Su cálculo está basado en la determinación del rendimiento cuántico efectivo de emisión de fluorescencia (Celis Plá *et al.*, 2014), para lo cual, se utilizó un Fluorímetro FMS2, Hansatech. Se midió sobre las mismas hojas en donde se midió Rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII) bajo intensidades de luz PAR por sobre los  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Estas intensidades son estimadas por la reacción del PSII ante el impulso de la radiación solar.

- Rendimiento



**Imagen 6.2:** a- Frutos de pimiento. b- Frutos de pimiento pesados en balanza para medir rendimiento (Imagen propia).

### Parámetros de estrés

- Contenido de prolina mediante el método de Bates *et al.* (1973).
- Conductividad relativa de las membranas celulares de hojas y raíces mediante el método de Lutts *et al.* (1996).
- Contenido de MDA mediante el método de Heath & Packer (1968).

### Parámetros relacionados a los hongos micorrizicos

- Presencia de hongos micorrícicos mediante la tinción de las raíces por el método de Phillips & Hayman, (1970).
- Porcentaje de micorrización o colonización micorrícica por el método de Trouvelot *et al.*, (1986).

#### Variables referidas a hongos nematófagos

- Persistencia del hongo en el suelo.

#### Diseño experimental

El ensayo se realizó siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado, con 10 repeticiones. Los datos se analizaron por ANOVA y las medias se compararon usando LSD ( $P < 0,05$ ) utilizando el programa estadístico SISVAR 2018. Para analizar las interacciones se siguió un diseño factorial 2k y se analizó con el programa Infostat 2018.

### 6.4- RESULTADOS

La reproducción del nematodo se vió afectada en los tratamientos inoculados con los microorganismos benéficos, tanto individualmente como combinados. La relación del peso fresco de la raíz con el número de huevos del nematodo, como la relación de la población final con la población inicial, es decir, el factor de reproducción (Fr) siguió la misma tendencia. El tratamiento B1BT fue el que obtuvo los valores más bajos, indicando que estos microorganismos afectan significativamente la reproducción del nematodo (Tabla 6.1).

**Tabla 6.1:** Número de huevos totales, huevos por gramo de raíz y factor de reproducción (Fr) de los tratamientos inoculados con *Purpureocillium lilacinum* (PL), *Rhizophagus intraradices* (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y las combinaciones de los tres en presencia de *N. aberrans*.

Tratamiento	Huevos totales	Huevos.gr <sup>1</sup> raíz	Fr
NI	87.833 a	1209,80 a	17,57 a
B1	37.833 b	638,53 b	7,57 b
PL	47.200 b	538,61 b	9,44 b
BT	28.466 b	359,42 b	5,69 bc

B1PL	26.766 b	355,69 b	5,35 bc
B1BT	18.133 b	368,18 b	3,62 c
PLBT	37.366 b	454,60 b	7,47 b
B1PLBT	32.000 b	433,60 b	6,40 b

---

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratatamientos ( $p < 0,05$ ).

Las plantas infestadas con *N. aberrans* presentaron raíces más oscuras y de menor tamaño lo cual puede ser explicado por el daño macroscópico observado no solo por la presencia de agallas encontradas sino también debido a la salida y entrada de los juveniles en las raíces provocando laceraciones y necrosis en las raíces (Shurtleff & Averre, 2000). En todos los casos se pueden observar diferencias significativas en el crecimiento de las raíces al comparar el mismo tratamiento en ausencia y presencia del nematodo, y el tratamiento control, sin microorganismos benéficos presenta las mayores diferencias (Imagen 6.3).



**Imagen 6.3:** **A-** Raíces del tratamiento control (NI) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **B-** Raíces del tratamiento inoculado con *Rhizophagus intraradices* (B1) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **C-** Raíces del tratamiento inoculado con *Purpureocillium lilacinum* (PL) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **D-** Raíces del tratamiento inoculado con *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **E-** Raíces del tratamiento inoculado con *Rhizophagus intraradices* B1 y *Purpureocillium lilacinum* (B1PL) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **F-** Raíces del tratamiento inoculado con *Rhizophagus intraradices* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (B1BT) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **G-** Raíces del tratamiento inoculado con *Purpureocillium lilacinum* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (PLBT) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **H-** Raíces del tratamiento inoculado con *Rhizophagus*

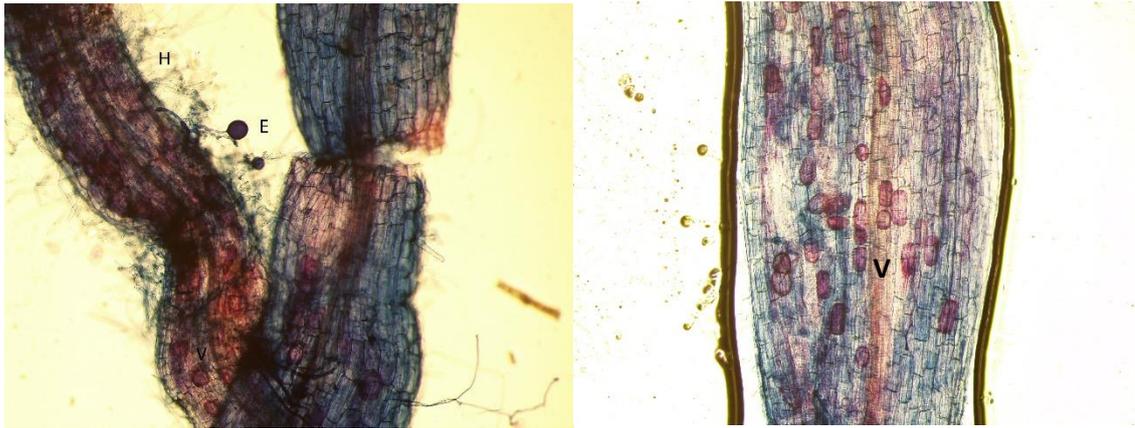
*intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* y *Purpureocillium lilacinum* (B1PLBT) en ausencia y presencia de *N. aberrans* (Imagen propia).

El porcentaje de micorrización fue alto en todos los tratamientos ensayados. En el tratamiento B1 fue mayor en ausencia del nematodo que en presencia, pero sin diferencias significativas. Los tratamientos B1PL, B1BT y B1PLBT obtuvieron mayor porcentaje de micorrización en presencia del nematodo que en ausencia sin diferencias significativas entre ellos. En ausencia del nematodo B1 obtuvo el mayor porcentaje de micorrización ( $p < 0,05$ ) y la combinación de los tres microorganismos el valor más bajo de micorrización. En presencia del nematodo este tratamiento B1PLBT también obtuvo el porcentaje de micorrización más bajo ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6.2).

El porcentaje de vesículas en ausencia del nematodo disminuyó en los tratamientos donde se combinaron los microorganismos con respecto a B1 solo. En presencia del nematodo, se observó la misma respuesta y además el % de vesículas disminuyó significativamente en el tratamiento B1PLBT comparado con los otros tratamientos (Tabla 6.2).

El % de hifas de B1BT fue el menor en ausencia del nematodo comparado con los demás tratamientos y comparado también con B1BT en presencia del nematodo. No hubo diferencias significativas entre tratamientos en presencia del nematodo. El tratamiento B1 N0 obtuvo mayor porcentaje de hifas que el tratamiento B1 N1 (Tabla 6.2).

En cuanto a los arbusculos, que son las estructuras de intercambio entre las plantas y el hongo micorrízico, el porcentaje fue mayor en los tratamientos en ausencia del nematodo que en presencia del mismo (Tabla 6.2). En presencia del nematodo, el tratamiento B1PLBT, obtuvo el valor más bajo comparado con los demás tratamientos (Tabla 6.2).



**Imagen 6.4:** Raíces de pimiento inoculadas con RI B1 en presencia de *N. aberrans*. H: Hifas; E: Espora; V: Vesículas (Imagen propia).

**Tabla 6.2:** Porcentaje de micorrización (% M), porcentaje de vesículas (% V), porcentaje de arbusculos (% A) y porcentaje de hifas (% H) de plantas de pimiento inoculadas con *Rhizophagus intraradices* (B1) y su combinación con *Purpureocillium lilacinum* (PL), y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) en presencia (N1) y ausencia de *N. aberrans* (N0)

<i>N. aberrans</i>	HMA	% M	% V	% H	% A
N0	B1	93,88 Aa	82,14 Aa	88,17 Aa	28,68 Aa
	B1PL	80,55 Ba	58,77 ABb	72,09 Aba	14,88 Ba
	B1BT	79,99 Ba	49,06 Bb	66,53 Bb	11,31 Ba
	B1PLBT	78,88 Ba	65,24 ABa	76,11 Aba	20,53 Aa
N1	B1	88,89 ABa	75,90 Aa	79,03 Ab	21,18 Aa
	B1PL	89,99 Aa	71,39 Aa	74,31 Aa	12,98 Ba
	B1BT	87,22 ABa	71,84 Aa	79,92 Aa	10,98 Ba
	B1PLBT	78,33 Ba	7,11 Bb	72,67 Aa	9,11 Bb

Medias seguidas por letras distintas indican diferencias significativas. Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas indican diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas ( $p < 0,05$ ).

En ausencia del nematodo el tratamiento PL obtuvo la mayor altura final seguido del tratamiento B1PLBT. El diámetro del tallo fue mayor en los tratamientos B1PLBT y PLBT. Estos resultados se reflejaron en el peso seco de las plantas tratadas con PLBT, B1PLBT y PL. En presencia del nematodo la altura final fue mayor en las plantas tratadas con BTPL y PL. El diámetro del tallo fue mayor en las plantas tratadas con PL y BT, mientras que el peso seco total fue mayor en las plantas tratadas con BT, PLBT y PL. El menor peso seco se obtuvo en las plantas en presencia de nematodos sin inocular con microorganismos benéficos. No hubo diferencias significativas entre ausencia y presencia de nematodos en altura final y diámetro del tallo. En peso seco total hubo diferencias significativas en los todos los tratamientos a excepción del tratamiento BT (Tabla 6.3). En cuanto a las interacciones, el análisis estadístico mostró que tanto para diámetro del tallo como para peso seco total no hubo interacciones. En cambio en altura se observó que hubo interacción en el tratamiento B1PL en presencia del nematodo. La misma no tuvo un efecto benéfico comparando con las inoculaciones individuales de B1 y PL siendo una interacción neutra.

**Tabla 6.3:** Altura, diámetro del tallo y peso seco total (PST) de plantas de pimiento inoculadas con *Rhizophagus intraradices* (B1) y su combinación con *Purpureocillium lilacinum* (PL), y *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (BT) en presencia (N1) y ausencia de *N. aberrans* (N0)

<i>N. aberrans</i>	Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro del tallo (cm)	PST (gr)
N0	NI	47,00 Ba	0,75 ABa	19,40 BCDA
	B1	44,60 Ba	0,76 ABa	17,20 CDA
	PL	54,50 Aa	0,72 ABa	20,20 BCa
	BT	47,75 Ba	0,79 Aa	18,80 CDA
	B1PL	47,90 Ba	0,79 Aa	18,40 BCDA
	B1BT	45,20 Ba	0,69 Ba	16,20 Da
	PLBT	47,50 Ba	0,80 Aa	26,00 Aa
	B1PLBT	49,60 ABa	0,84 Aa	21,60 Ba
N1	NI	51,50 Ba	0,77 ABa	13,40 Db
	B1	50,60 Ba	0,71 Ba	14,00 CDb

N1	PL	52,80 Ba	0,79 Aa	16,40 ABb
	BT	47,75 Ba	0,80 Aa	18,50 Aa
	B1PL	49,40 Ba	0,73 Ba	15,30 BCb
	B1BT	48,30 Ba	0,71 Ba	12,75 CDb
	PLBT	53,70 Aa	0,76 ABa	16,60 ABb
	B1PLBT	40,60 Ba	0,75 ABa	14,00 CDb

Medias seguidas por letras distintas indican diferencias significativas. Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas ( $p < 0,05$ ).

En presencia del nematodo, la conductancia estomática disminuyó significativamente en todos los tratamientos. Sin embargo, se observó que los tratamientos inoculados con microorganismos obtuvieron mayor conductancia que el tratamiento NI, en presencia del nematodo. Los tratamientos con mayor conductancia fueron B1PL, B1PLBT y B1BT (Tabla 6.4). En ausencia del nematodo los valores oscilaron entre 60 y 144 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> considerándose por encima de 100 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> los valores normales (Tabla 6.4).

En cuanto al rendimiento máximo del fotosistema, en ausencia del nematodo no hubo diferencias significativas. En presencia del nematodo, el rendimiento bajó en todos los tratamientos, en especial en NI, obteniendo los valores más altos los tratamientos B1PL y B1PLBT (Tabla 6.4).

Algo similar a lo ocurrido con el rendimiento máximo del fotosistema II ocurrió con la tasa de transferencia de electrones (ETR) donde no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con microorganismos, en ausencia del nematodo. En presencia del nematodo disminuyó la tasa de transferencia en todos los tratamientos, pero los valores de las plantas inoculados con microorganismos fueron mayores que el tratamiento NI destacándose el tratamiento PLBT seguido de B1PL, PL y B1PLBT (Tabla 6.4).

El análisis estadístico mostró que no hubo interacciones para estos tres parámetros analizados.

**Tabla 6.4:** Conductancia estomática (G), transferencia de electrones (ETR), rendimiento máximo del fotosistema II (Fv/Fm) de plantas de pimiento inoculadas y no inoculadas

con *Purpureocillium lilacinum* (PL), *Rhizophagus intraradices* (B1), *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (BT) y las combinaciones de los tres en presencia (N1) y ausencia de *N. aberrans* (N0).

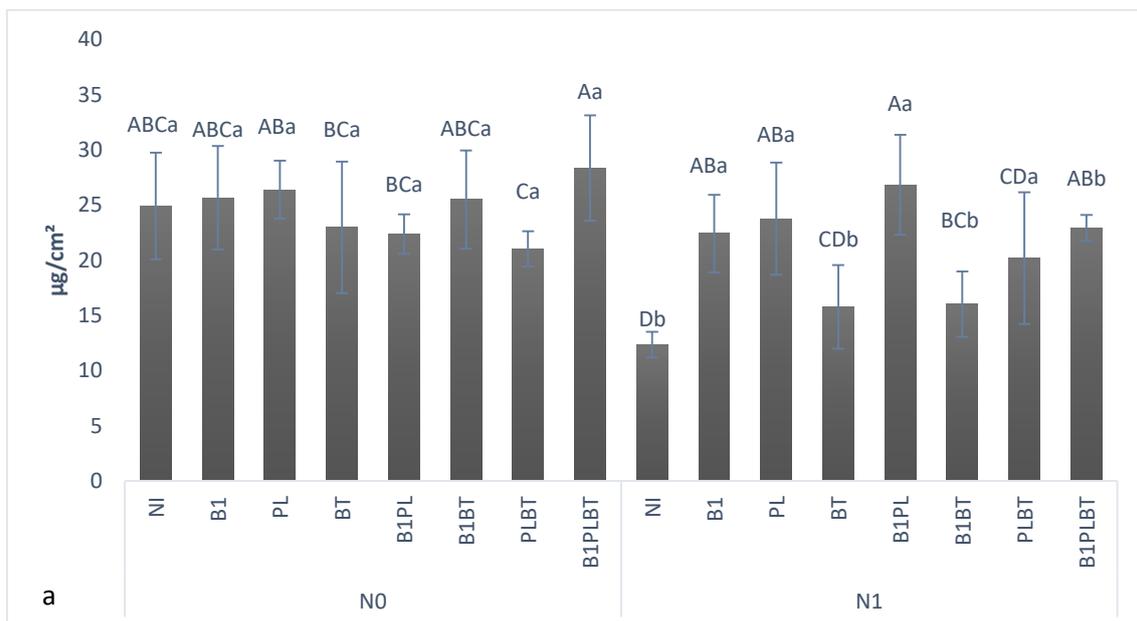
<i>N. aberrans</i>	Tratamiento	G (mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Fv/Fm	ETR
N0	NI	105,63 Ba	0,757 Aa	0,1914 Aa
	B1	91,53 BCa	0,701 Aa	0,1716 Aa
	PL	87,35 BCa	0,748 Aa	0,1918 Aa
	BT	71,00 Ca	0,723 Aa	0,1378 Aa
	B1PL	62,75 Ca	0,742 Aa	0,1862 Aa
	B1BT	91,60 BCb	0,730 Aa	0,1878 Aa
	PLBT	116,55 ABa	0,748 Aa	0,1628 Aa
	B1PLBT	144,20 Aa	0,716 Aa	0,1910 Aa
N1	NI	29,90 Eb	0,521 Db	0,0590 Cb
	B1	72,55 ABCDa	0,646 BCa	0,0670 BCb
	PL	63,35 CDEa	0,659 ABb	0,0855 Aa
	BT	52,90 DEa	0,588 Cb	0,0677 BCb
	B1PL	103,70 Aa	0,714 Aa	0,0852 Ab
	B1 BT	90,25 ABCa	0,625 BCb	0,0692 BCb
	PLBT	66,85 BCDB	0,654 Bb	0,1178 Ab
	B1PLBT	99,85 ABb	0,681 Aba	0,0858 Ab

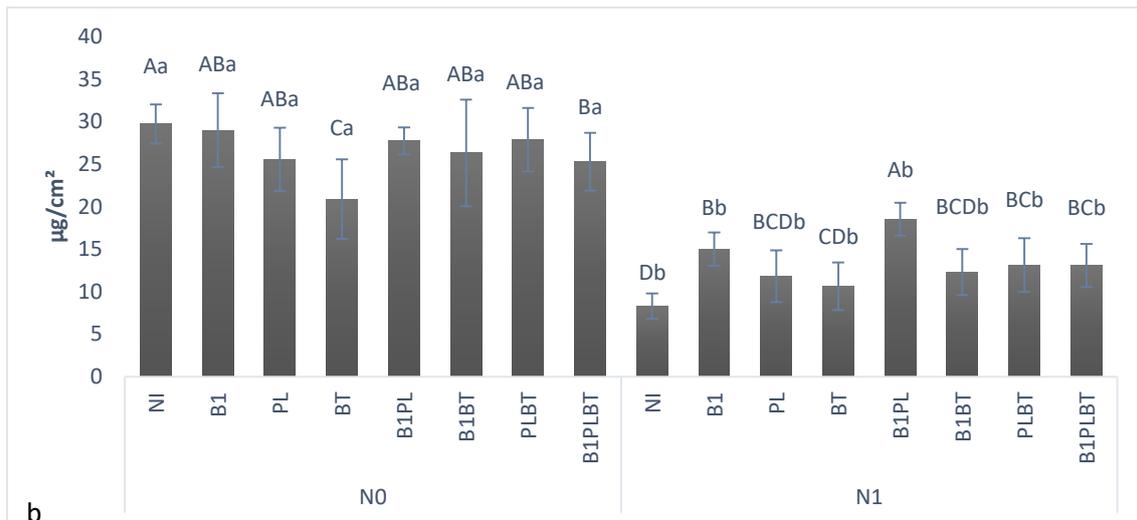
Medias seguidas por letras distintas indican diferencias significativas. Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas ( $p < 0,05$ ).

En dos momentos del ensayo, a los 90 días después del trasplante y 10 días después de la primera extracción Se tomaron muestras para la cuantificación del contenido de clorofila. Los resultados de la primera medición arrojaron que las plantas inoculadas con los microorganismos en presencia del nematodo obtuvieron mayor contenido de clorofila. El tratamiento B1PL fue el que mostró el mayor contenido (Figura 6.1a). Según

el análisis estadístico hubo interacciones en los tratamientos B1PL, una interacción positiva ya que el contenido de clorofila fue mayor que los demás tratamientos, en especial los que tenían inoculación individual de B1 y PL. Otra interacción fue en el tratamiento B1BT, pero en este caso el contenido de clorofila fue menos que la inoculación individual con B1 y no hubo diferencias con el tratamiento BT por lo cual la interacción podría ser neutra o negativa.

En el segundo muestreo se pudo observar en las plantas inoculadas con el nematodo como el daño provocado por *N. aberrans* se fue acrecentando y en consecuencia el contenido de clorofila fue disminuyendo. Aun así, las plantas tratadas con microorganismos obtuvieron valores más altos comparado con el tratamiento sin inocular (NI), siendo el tratamiento B1PL el que obtuvo mayor contenido de clorofila (Figura 6.1b). El análisis estadístico mostró que hubo interacción en los tratamientos B1PLBT en ausencia del nematodo, y en los tratamientos PLBT y B1BT en presencia del nematodo. Todas estas interacciones son neutras debido a que no hubo diferencias con los tratamientos inoculados individualmente.

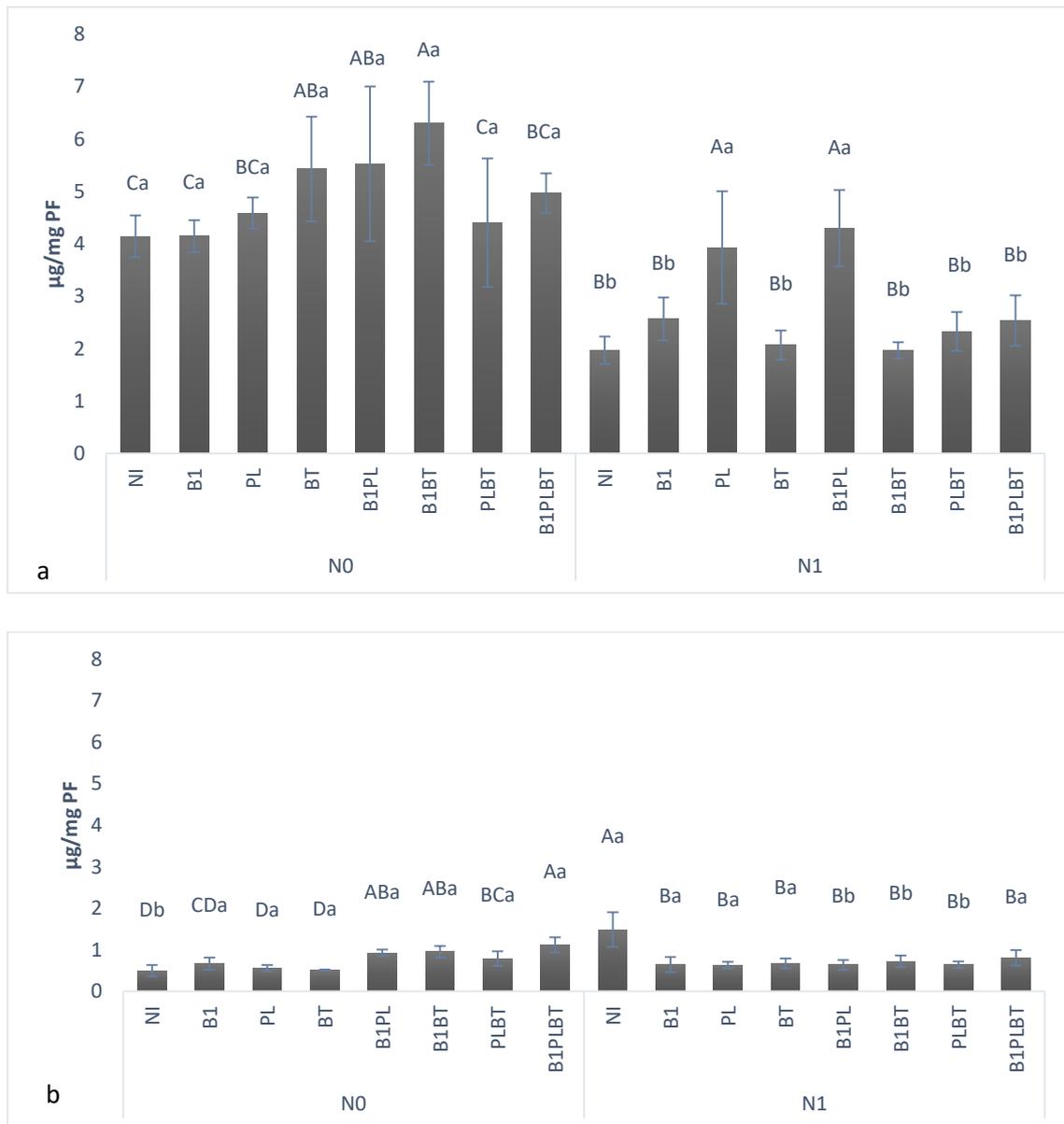




**Figura 6.1:** Contenido de clorofila en hojas de plantas de pimiento del primer muestreo (a) y del segundo muestreo (b) no inoculadas (NI) e inoculadas con los microorganismos seleccionados individual y combinados en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

En ausencia del nematodo el contenido de proteínas foliares fue mayor en las plantas inoculadas con los microorganismos benéficos. En presencia del nematodo el contenido de proteínas disminuyó en todos los tratamientos. Sin embargo, los tratamientos B1PL y PL tuvieron mayor contenido comparado con los demás tratamientos (Figura 6.2a). El análisis estadístico mostró que no hubo interacciones entre los tratamientos.



**Figura 6.2:** Contenido de proteínas en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los microorganismos seleccionados individual y combinados en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre bacterias para un mismo tratamiento de infección con *N. aberrans* ( $p < 0,05$ ).

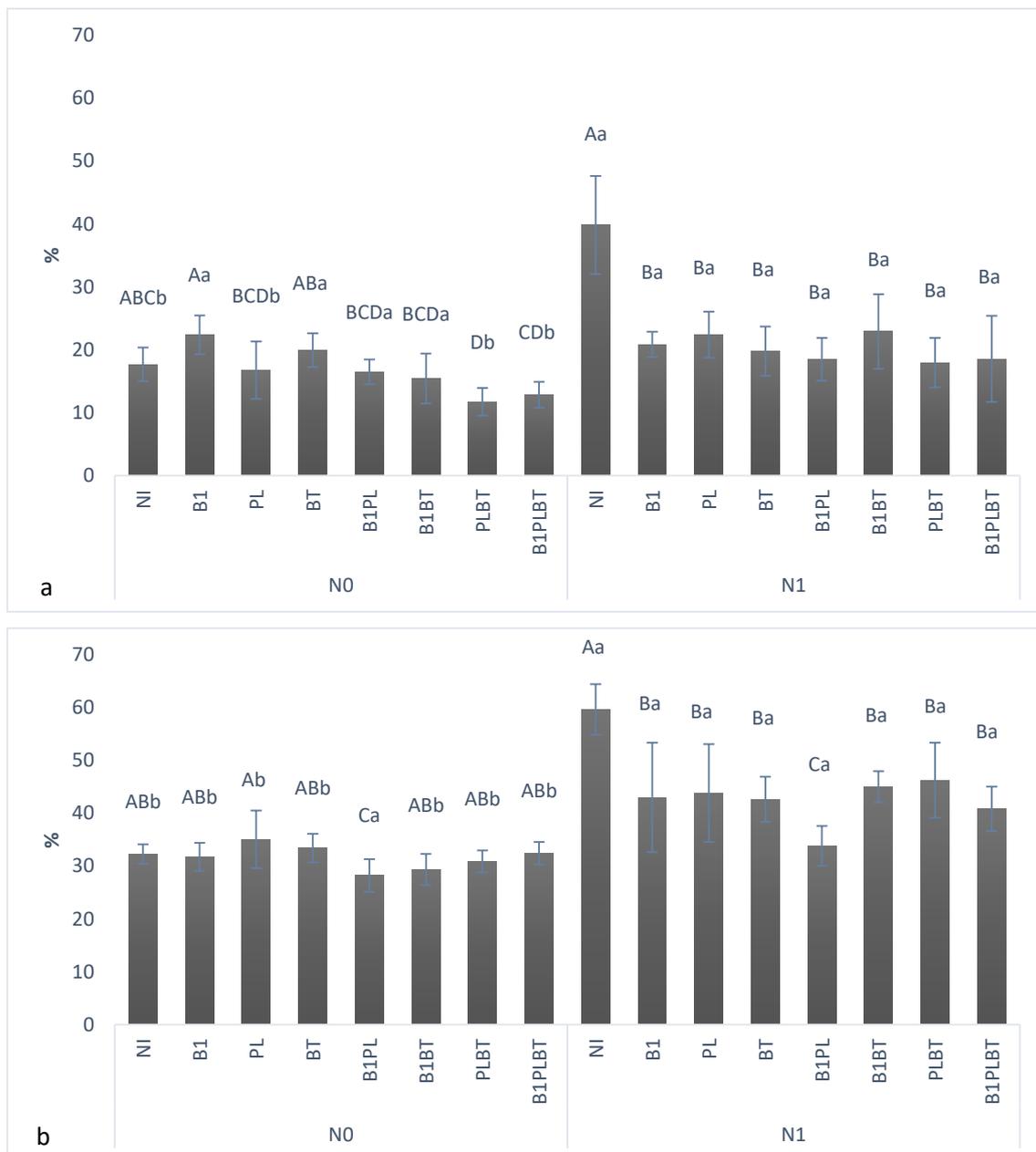
El contenido de proteínas en raíces, en ausencia del nematodo fue mayor en aquellos tratamientos donde se combinaron los microorganismos. En presencia del nematodo, el contenido de proteínas fue mayor en el tratamiento NI, mientras que disminuyó en los tratamientos inoculados con los microorganismos, sin diferencias significativas entre

estos tratamientos (Figura 6.2b). El análisis estadístico mostró que no hubo interacciones entre los tratamientos.

A continuación, se muestran los resultados más relevantes de los parámetros de estrés medidos.

La conductividad relativa de las membranas celulares de las hojas fue mayor en presencia del nematodo que en ausencia del mismo. A su vez los tratamientos inoculados con microorganismos, tanto en forma individual como combinados, tuvieron una baja conductividad comparado con NI ( $p < 0,05$ ), en presencia del nematodo. Dentro de estos tratamientos se destaca B1PL con la conductividad más baja dentro de este grupo (Figura 6.3a). El análisis estadístico realizado mostró que hubo interacción entre los microorganismos en los tratamientos B1PL, B1BT y PLBT en presencia del nematodo. Dentro de estas interacciones se pudo observar que el tratamiento B1PL tuvo un efecto positivo al bajar la conductividad relativa en comparación a la inoculación individual de B1 y PL. Los otros dos tratamientos tuvieron una interacción neutra ya que no hubo diferencias significativas con las inoculaciones individuales de B1, PL y BT.

De la misma manera, la conductividad relativa de las membranas celulares de las raíces fue mayor en los tratamientos en presencia del nematodo, al igual que en las hojas. Dentro de estos tratamientos NI, sin inoculación con microorganismos beneficiosos, fue significativamente mayor que los demás (Figura 6.3b). Si bien el análisis estadístico mostró que hubo interacciones en los tratamientos B1BT y PLBT, estos tratamientos no tuvieron diferencias significativas con los tratamientos donde se inoculó individualmente con B1, PL y BT por lo cual no se observó un beneficio adicional sino que se trata de una interacción neutra.



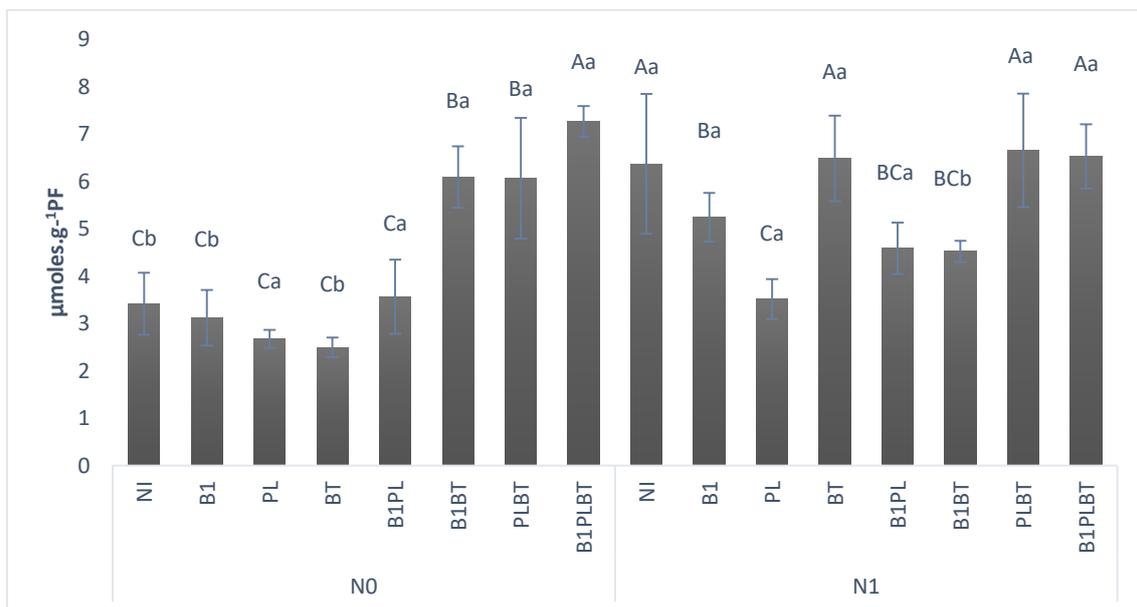
**Figura 6.3:** Conductividad relativa de membranas celulares en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los microorganismos seleccionados individual y combinados en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Otro parámetro medido fue el contenido de prolina. En hojas, el contenido de prolina fue mayor en presencia del nematodo que en ausencia del mismo. En este último caso, el

tratamiento B1PLBT tuvo mayor acumulación de prolina seguido de B1BT y PLBT. En presencia del nematodo los tratamientos NI, BT, PLBT y B1PLBT tuvieron mayor acumulación del osmolito con respecto a los demás tratamientos ( $p < 0,05$ ) (Figura 6.4). El análisis estadístico mostró que hubo interacciones en los tratamientos B1PLBT en ausencia del nematodo que claramente se puede considerar una interacción negativa debido a que en ausencia de estrés la acumulación de prolina fue alta. También hubo interacciones en los tratamientos B1PLBT, B1PL y B1BT en presencia del nematodo. En cuanto al primer tratamiento, al igual que en ausencia del nematodo, se observó una alta acumulación de prolina por lo cual la interacción es negativa. B1PL mostró una tendencia a acumular menos prolina que NI. Aún así, la acumulación fue mayor comparado con la inoculación individual de PL. La presencia de PL en el tratamiento explicaría esa tendencia. B1BT mostró menor acumulación de prolina que los tratamientos B1 y BT inoculados individualmente logrando una interacción positiva.

En cuanto al contenido de prolina en raíces, los resultados no mostraron una tendencia clara por lo cual no se presentan los resultados.

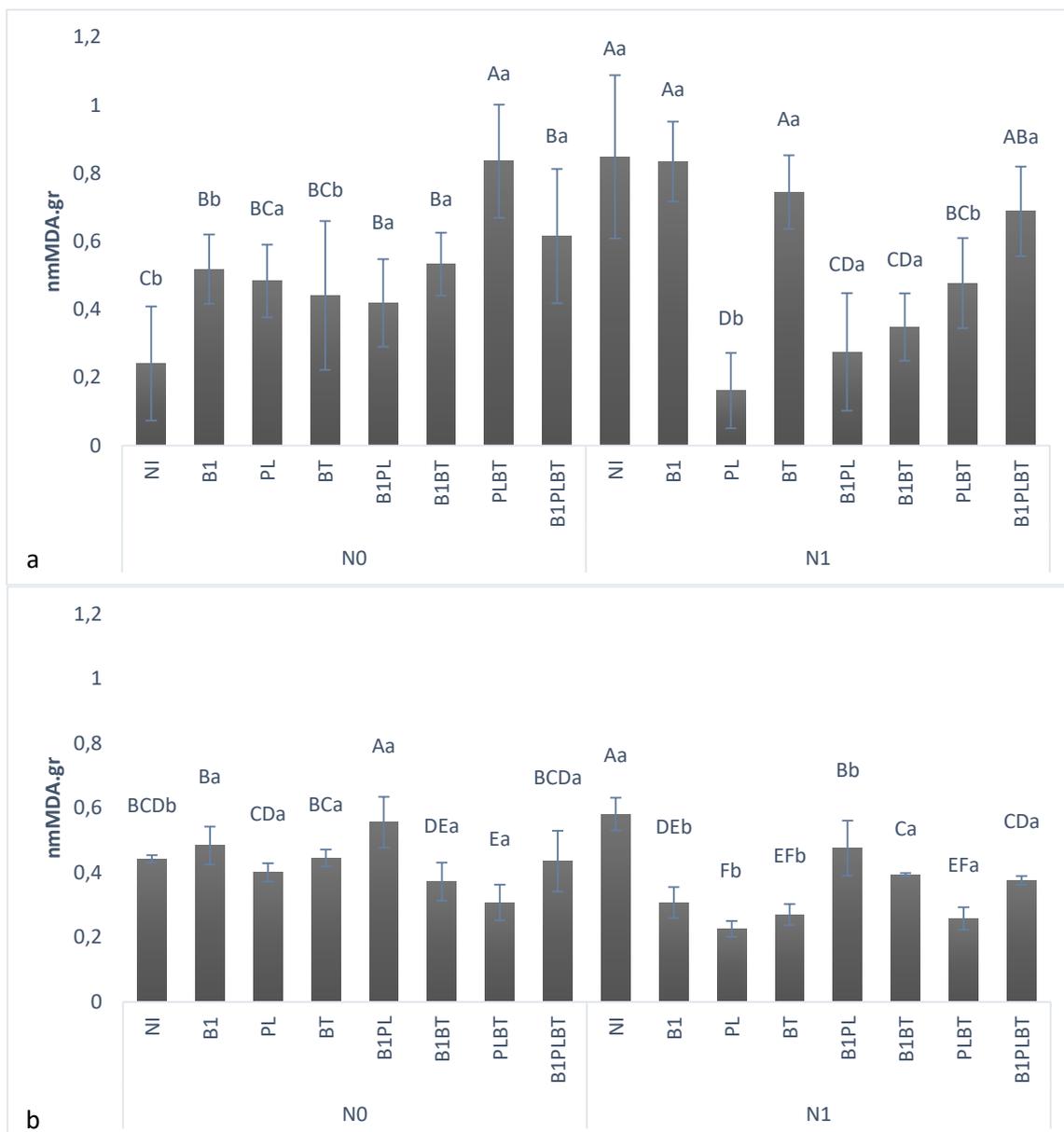


**Figura 6.4:** Contenido de prolina en hojas de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los microorganismos seleccionados individual y combinados en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

El contenido de MDA en hojas y en ausencia del nematodo fue mayor en los tratamientos inoculados con microorganismos comparado con NI, siendo mayor el contenido en el tratamiento PLBT. En presencia del nematodo, los tratamientos NI, B1 y BT tuvieron mayor contenido de MDA ( $p < 0,05$ ). Los tratamientos PL, B1PL, PLBT y B1BT obtuvieron los valores más bajos (Figura 6.5a). Hubo interacciones en los tratamientos B1PLBT en ausencia del nematodo, la misma es neutra ya que no se vieron diferencias significativas con las inoculaciones individuales; y en B1PLBT, PLBT, B1PL y B1BT en presencia del nematodo. Si bien los resultados indicaron que hubo un bajo contenido de MDA en estos tratamientos la respuesta de la interacción puede explicarse en que en todos los tratamientos está la presencia de PL que individualmente logró bajar el contenido de MDA significativamente más que en los tratamientos combinados, por lo cual no hubo beneficio en las interacciones.

En raíces el contenido de MDA en los tratamientos en ausencia del nematodo no se ve una tendencia clara sin embargo los valores más bajo fueron de los tratamientos B1BT y PLBT. En presencia del nematodo, el tratamiento NI tuvo mayor contenido de MDA con respecto a los demás tratamientos que fueron inoculados con los microorganismos benéficos, siendo los tratamientos B1, PL, BT y PLBT los que obtuvieron menor contenido de MDA (Figura 6.5b). El análisis estadístico indicó que hubo interacciones en los tratamientos B1BT y PLBT en presencia del nematodo. El tratamiento B1BT mostró tener más contenido de MDA que las inoculaciones individuales de B1 y BT por lo cual se puede decir que la interacción fue negativa. En cambio, PLBT no tuvo diferencias significativas con PL y BT por lo cual la interacción fue neutra.



**Figura 6.5:** Contenido de MDA en hojas (a) y raíces (b) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) e inoculadas con los microorganismos seleccionados individual y combinados en ausencia (N0) y presencia (N1) de *N. aberrans* en el suelo.

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre presencia y ausencia de *N. aberrans*, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

El rendimiento de los frutos fue medido como número de frutos totales y peso de los frutos. El mismo se vio afectado por las características del ensayo, es decir, las plantas de pimiento crecieron en macetas y eso limitó el crecimiento y por lo tanto el rendimiento;

pero igualmente se pudo observar claramente como la presencia del nematodo disminuyó el peso de los frutos. A su vez, si bien en algunos tratamientos las plantas dieron mayor cantidad de frutos por planta comparando con los tratamientos en ausencia del nematodo, éstos eran pequeño y deformes. Dentro de estos tratamientos, en presencia del nematodo, se destaca B1PL que obtuvo mayor número de frutos por planta y mayor peso por fruto. En ausencia del nematodo destacaron los tratamientos PLBT y B1PLBT (Tabla 6.5).

**Tabla 6.5:** Efecto de la inoculación con *Purpureocillium lilacinum* (PL), *Rhizophagus intraradices* (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y la combinación de los tres microorganismos en el número y el peso de frutos totales de cada tratamiento en presencia (N1) y ausencia de *N. aberrans* (N0).

<i>N. aberrans</i>	Tratamiento	N° frutos totales	gr.fruto <sup>-1</sup>
N0	NI	11 Ba	65,00 Aba
	B1	14 Aa	59,93 Ba
	PL	9 Cb	61,64 Aba
	BT	12 Aba	55,93 Ba
	B1PL	12 Aba	58,14 Aba
	B1BT	10 Ba	64,29 Aba
	PLBT	12 ABb	68,00 Aa
	B1PLBT	11 Bb	68,00 Aa
N1	NI	10 BCa	55,33 Aba
	B1	8 Cb	50,40 Ba
	PL	12 Ba	58,14 Aba
	BT	10 BCb	63,93 Ba
	B1PL	12 Ba	60,86 Aba
	B1BT	9 Ca	53,33 Aba
	PLBT	17 Aa	54,14 Aba

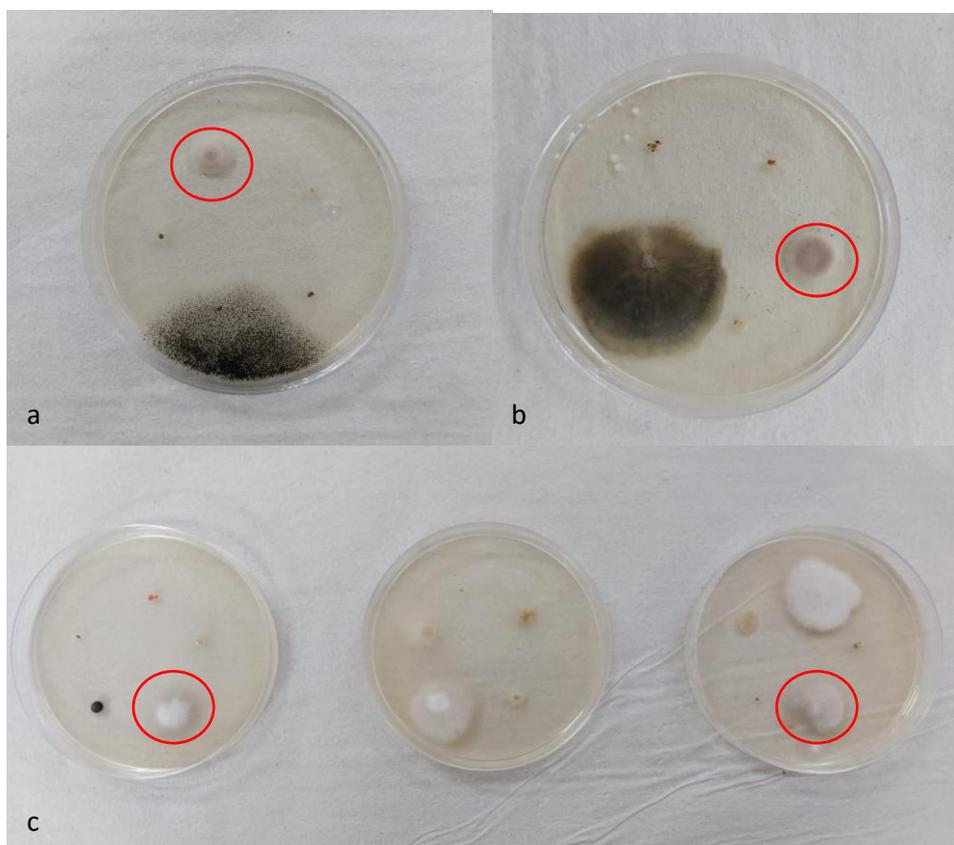
B1PLBT

16 Aa

54,50 Aba

Medias seguidas por letras distintas indican diferencias significativas. Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas indican diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas ( $p < 0,05$ ).

El cultivo de partículas de suelo en medio agar papa glucosado, de los tratamientos en donde se hallaba presente el hongo *P. lilacinum* mostró que al finalizar el ensayo hubo presencia del mismo en el suelo. Tanto la presencia del nematodo como de los otros microorganismos no afectaron su persistencia en el suelo (Imagen 6.5). El tratamiento control no formó colonias.



**Imagen 6.5:** Presencia de *P.lilacinum* en cultivos de suelos (en círculo rojo) de los tratamientos PL (a), B1PL (b), PLBT, NI, B1PLBT en orden de izq. a der. (c) (Imagen propia).

## 6.5- DISCUSION

En este capítulo se estudiaron los posibles beneficios de combinar distintos microorganismos seleccionados frente al ataque de *N. aberrans* en plantas de pimiento.

Los resultados mostraron que todos los tratamientos realizados redujeron la población de *N. aberrans* en las raíces. La combinación de RI B1 y BT fue la más efectiva junto con el tratamiento que tenía la combinación RIB1 y PL. Se sabe muy poco del efecto de los antagonistas utilizados de forma combinada para el control de *N. aberrans* pero si se ha documentado para el control de otros nematodos fitopatógenos. Hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) tienen potencial para controlar las enfermedades transmitidas por el suelo, incluidos los nematodos parásitos de plantas tanto en forma individual como combinados (Sharma & Sharma, 2017). Elsen *et al.* 2008 observaron que la colonización de las raíces de *Musa sp.* por HMA y PGPR, individualmente o en combinación, tuvieron un efecto negativo sobre el desarrollo de la población de *M. incognita* expresado por una baja del número de masas de huevos. Esto pudo deberse a la inducción de resistencia sistémica de las plantas a los nematodos (Reddy, 2012) o afectando a los mismos con los exudados liberados (Shreenivasa *et al.*, 2007). A diferencia de lo sucedido en nuestros resultados, en distintos cultivares de tomate micorrizados, se observaron que no hubo ningún efecto sinérgico con *B. megaterium* (Hol & Cook, 2005) pero si se observaron beneficios en *Capsicum annuum* cv. Perico donde la disminución en la reproducción de nematodos era mayor cuando los HMA y *Bacillus megaterium* se usaron juntos en comparación con las plantas inoculadas individualmente. Similares resultados se obtuvieron al combinar *Glomus sp* y *Bacillus sp.* para controlar *M. incognita* en garbanzo (Akhtar & Siddiqui 2007). Sharma & Sharma, 2017 al combinar *Rhizophagus irregularis* y dos aislados de *Pseudomonas spp.* lograron no solo una reducción de la población sino también un aumento de clorofila, crecimiento de las plantas y una disminución del contenido de MDA. La inoculación de *C. annuum* con el hongo micorrícico arbuscular *Rhizoglyphus fasciculatum* y el hongo nematófago *P. lilacinum* mostró un aumento significativo en la parasitación de huevos siendo más efectivo cuando se practicó la inoculación doble.

En cuanto a la micorrización, no se observó que *B. thuringiensis* y *P. lilacinum* hayan afectado la micorrización, al igual que no se afectó la persistencia de *P. lilacinum* en el suelo. Al- Raddad (1995) informó que la colonización micorrícica no se vió afectada por la inoculación de raíces de tomate con *P. lilacinum*. Mientras que en tomate frente al ataque de *M. incognita*, la colonización por *G. intraradices* se redujo en presencia de hongos antagonísticos (*P. lilacinum*, *Pochonia chlamydosporia*, *Trichoderma harzianum*) (Siddiqui & Akhtar, 2008). También se evidenció que las micorrizas no son afectadas por las PGPR al ser inoculadas a la siembra y al trasplante respectivamente (Liu *et al.*, 2012; Flor-Peregrin *et al.*, 2012). Además, Rumbos (2005) mostró una baja competitividad de *P. lilacinum* PL251 frente a otros hongos de biocontrol como

*Trichoderma spp.* indicando una alta compatibilidad al igual que con nematodos entomopatógenos que, por más que sean nematodos, PL251 no afectó la supervivencia ni la eficacia de *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *H. megidis* cuando se coaplicaron al suelo (Rumbos *et al.*, 2007).

Como se mencionó en otros capítulos el aumento de la biomasa de raíces es una característica bien documentada de la colonización micorrícica (Smith & Read 2008; Barea *et al.*, 2005) al igual que la promoción del crecimiento que producen las rizobacterias (Reddy, 2012; Dames, 2014). También se ha documentado que *P. lilacinum* es un microorganismo que induce un aumento en el crecimiento y biomasa de las plantas (Correa Gutierrez, 2011; Hashem & Abo-Elyousr, 2011). Liu *et al.* (2012) indicaron que los HMA y los PGPR pueden estimularse entre sí y tener una actividad sinérgica en la mejora del crecimiento de las plantas y reducir sus enfermedades. En nuestros resultados no hubo diferencias significativas entre B1BT y las inoculaciones individuales para altura y peso seco por lo cual no hubo una interacción sinérgica. Lo contrario sucedió con *P. lilacinum* y PLBT que obtuvieron mayor altura y peso seco. Valencia Serna *et al.* (2014) al utilizar *P. lilacinum* para el control de *Radopholus sp.* en banano, obtuvieron los mayores valores de peso seco aéreo y de raíz siguiendo con el tratamiento en el que combinaron *P. lilacinum* con micorrizas y rizobacterias. Algo similar ocurrió con plantas de lechuga inoculadas con *P. lilacinum* y *B. subtilis* frente al ataque de *Meloidogyne spp.* (Prakob *et al.*, 2009). A su vez se ha reportado que la combinación de *Purpureocillium lilacinum* y *Bacillus sp.* ha logrado no sólo bajar la población y tasa de reproducción de *Meloidogyne spp.* sino también mejorar parámetros de crecimiento (Khalil *et al.*, 2012).

En cuanto a las combinaciones que se utilizaron en este estudio, sobresalió la combinación de *R. intraradices* B1 y *P. lilacinum* PLSC # 876. Esta combinación logró reducir en casi un 70% la población de nematodos en las raíces de las plantas de pimiento comparado con el tratamiento sin inocular. También, frente a la presencia de *N. aberrans*, el porcentaje de micorrización no se vio afectado siendo el porcentaje más alto comparado con los demás tratamientos. En los parámetros de estrés medidos, contenido de prolina, de MDA y conductividad relativa de las membranas celulares, el análisis estadístico mostró que hubo interacción positiva o neutra a diferencia de las demás interacciones, al igual que en el contenido de clorofila. También, a pesar de que no se observaron interacciones entre los microorganismos en los parámetros de rendimiento medidos, se apreció una tendencia a mejorar estos parámetros en el tratamiento B1PL ante la presencia del nematodo. Para concluir, se observó que tanto las inoculaciones individuales como combinados lograron reducir la población de *N.*

*aberrans*. En los tratamientos donde se combinaron microorganismos, se pudo lograr un efecto positivo para la reducción del número nematodos, pero no se podría decir que hubo sinergismo. B1BT y B1PL redujeron significativamente la población de nematodos, demostrando una interacción positiva entre los microorganismos. Al igual que en los parámetros de crecimiento, fisiológicos y de estrés medidos. Como se mencionó anteriormente, el tratamiento B1PL no solo demostró tener una interacción positiva en la reducción de nematodos sino también en cuanto a la protección del cultivo demostrando una interacción sinérgica, lo que la hace una opción factible de utilizar para el control de nematodos, siendo recomendable inocular la micorriza a la siembra y *P. lilacinum* al trasplante, como una estrategia de manejo sustentable de acuerdo a la experiencia recolectada en este ensayo.

## 6.6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akhtar, M. S., & Siddiqui, Z. A. (2007). Effects of *Glomus fasciculatum* and *Rhizobium* sp. on the growth and root-rot disease complex of chickpea. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 40(1), 37-43.

Al-Raddad, A. M. (1995). Interaction of *Glomus mosseae* and *Paecilomyces lilacinus* on *Meloidogyne javanica* of tomato. *Mycorrhiza*, 5(3), 233-236.

Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (1997). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens—an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6(6), 457-464.

Barea, J. M., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions* (pp. 195-212). Springer, Berlin, Heidelberg.

Bates, L. S., Waldren, R. P., & Tease, I. D. (1973). Rapid determination of the proline for stress studies. *Plant Soil*, 85: 107-129.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Bravo, A., Gill, S. S., & Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435.

Celis-Plá, P. S. M., Martínez, B., Quintano, E., García-Sánchez, M., Pedersen, A., Navarro, N. P., & Korbee, N. (2014). Short-term ecophysiological and biochemical responses of *Cystoseira tamariscifolia* and *Ellisolandia elongata* to environmental changes. *Aquatic Biology*, 22, 227-243.

Coolen, W. A. (1979). Methods for the extraction of *Meloidogyne spp.* and other nematodes from roots and soil. Pp. 317-330 in F. Lamberti and C.E. Taylor, eds. Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species) Systematics, Biology and Control. Academic Press, New York, NY, U.S.A.

Correa Gutierrez, P. (2011). Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento de microorganismos extraídos de suelos supresivos sobre plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y su influencia en la calidad de plántula. Trabajo monográfico. Escuela Superior de Ingeniería. Universidad de Almería.

Dames, J. F. (2014). Biological Control: PGPR and Arbuscular Mycorrhizal Fungi Working Together. In *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses* (pp. 39-53). Springer, New York, NY.

Elsen, A., Gervacio, D., Swennen, R., & De Waele, D. (2008). AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa sp.*: a systemic effect. *Mycorrhiza*, 18(5), 251-256.

Flor-Peregrín, E., Azcón, R., Salmerón, T., & Talavera, M. (2012). Biological protection conferred by *Glomus spp.* and *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne incognita* in tomato and pepper. *Induced resistance in plants against insects and diseases*, 83, 215-218.

Gortari, M. C., & Hours, R. A. (2019). In vitro antagonistic activity of Argentinean isolates of *Purpureocillium lilacinum* on *Nacobbus aberrans* eggs. *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)*, 9(1), 164-174.

Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.

Hashem, M., & Abo-Elyousr, K. A. (2011). Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. *Crop Protection*, 30(3), 285-292.

Hol, W. G., & Cook, R. (2005). An overview of arbuscular mycorrhizal fungi–nematode interactions. *Basic and Applied Ecology*, 6(6), 489-503.

- Hussey, R. S., & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.*, including a new technique. *Plant Disease Report*, 57, 1025-1028.
- Khalil, M. S., Kenawy, A., Gohrab, M. A., & Mohammed, E. E. (2012). Impact of microbial agents on *Meloidogyne incognita* management and morphogenesis of tomato. *Journal of Biopesticides*, 5(1), 28.
- Liu, R., Dai, M., Wu, X., Li, M., & Liu, X. (2012). Suppression of the root-knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood] on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria. *Mycorrhiza*, 22(4), 289-296.
- Lutts, S., Kinet, J. M., & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78(3), 389-398.
- Oostenbrink, M. (1966). Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Major characteristics of the relation between nematodes and plants*, (66-4).
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158–161.
- Prakob, W., Nguen-Hom, J., Jaimasit, P., Silapapongpri, S., Thanunchai, J., & Chaisuk, P. (2009). Biological control of lettuce root knot disease by use of *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Paecilomyces lilacinus*. *Journal of Agricultural Technology*, 5(1), 179-191.
- Reddy, P. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In *Recent advances in crop protection* (pp. 131-158). Springer, New Delhi.
- Rumbos, C. (2005) Ecological studies on *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and their importance for the biological control of plant parasitic-nematodes and environmental risk assessment. Cuvillier Verlag Göttingen.
- Rumbos, C., Reimann, S., Kiewnick, S., & Sikora, R. A. (2006). Interactions of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 with the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: implications for *Meloidogyne incognita* control on tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 16:981–986
- Rumbos, C., Mendoza, A., Kiewnick, S., & Sikora, R. A. (2007). Effect of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 on the survival and virulence of entomopathogenic nematodes under laboratory conditions. *Nematol Mediterranea*, 35:103–107.

- Sharma, I. P., & Sharma, A. K. (2017). Co-inoculation of tomato with an arbuscular mycorrhizal fungus improves plant immunity and reduces root-knot nematode infection. *Rhizosphere*, 4, 25–28.
- Shreenivasa, K. R., Krishnappa, K., & Ravichandra, N. G. (2007). Survival and penetration of *Meloidogyne incognita* larvae in tomato roots in presence of arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*. *Karnataka J Agric Sci* 20:166–167.
- Shurtleff, M. C., & Averre, C. W. (2000). *Diagnosing plant diseases caused by nematodes* (No. SB998. N4 S58 2000).
- Siddiqui, Z. A., & Akhtar, M. S. (2008). Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 18(3), 279-290.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. 3ra edición. New York. Academic Press.
- Sosa, A. L., Rosso, L. C., Salusso, F. A., Etcheverry, M. G., & Passone, M. A. (2018). Screening and identification of horticultural soil fungi for their evaluation against the plant parasitic nematode *Nacobbus aberrans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(5), 1-12.
- Tambussi, E. A., & Graciano, C. (2010). La fluorescencia modulada de la clorofila. Método del pulso saturante. Técnicas en medición en ecofisiología vegetal. Conceptos y procedimientos. Ed.: Fernández, M. L., Gyenge, J. E. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. p. 119-127.
- Trouvelot, A., Kough, J. L., & Gianinazzi-Pearson, V. (1986). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En: 'Physiological and genetical aspects of mycorrhizae'. INRA, Paris, 101-109.
- Valencia Serna, R. A., Guzmán Piedrahita, Ó. A., Villegas Estrada, B., & Castaño Zapata, J. (2014). Manejo integrado de nematodos fitoparásitos en almácigos de plátano dominico hartón (*Musa AAB Simmonds*). *Luna Azul*, (39), 165-185.
- Vos, C., Geerinckx, K., Mkandawire, R., Panis, B., De Waele, D., & Elsen, A. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi affect both penetration and further life stage development of root-knot nematodes in tomato. *Mycorrhiza*, 22(2), 157-163.

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls A and B, as well as Total caroteinds, using various solvents with Spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307-313.

## **Capítulo 7**

### **Conclusiones y consideraciones finales**

## 7.1- Conclusiones generales

- *Nacobbus aberrans* procedente del CHLP afecta a las plantas de pimiento provocando alteraciones morfofisiológicas relativas a la diferenciación de agallas en las raíces producidas por las hembras sedentarias.

- Hongos formadores de micorrizas arbusculares específicos como *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus intraradices* cepa B1 y cepa A2 son efectivos en el control de *N. aberrans* en pimiento, involucrando mecanismos de acción directa (reducción de la población de nematodos de las raíces, menor número de huevos) o indirecta (mitigación de parámetros indicadores de estrés en planta y la promoción de la misma). *R. intraradices* B1 es el hongo formador de micorrizas arbusculares que mostró el mejor efecto de atenuación del estrés causado por el nematodo.

- Hongos nematófagos como *P. lilacinum* LPSC #876 y *P. ostreatus* aislamiento IIBIO reducen la carga de *N. aberrans* en las raíces y mejoran la performance de las plantas de pimiento, promoviendo el crecimiento de las plántulas cuando son aplicados en la etapa del trasplante aún en presencia del nematodo. Sin embargo, *P. lilacinum* LPSC #876 es el hongo saprófito que mostró el mejor efecto de atenuación del estrés causado por el nematodo, siendo incluso potencialmente persistente en el suelo rizosférico.

- Las rizobacterias *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* son efectivas en la reducción de la carga de nematodos en las raíces de pimiento, ejerciendo también efectos benéficos sobre el crecimiento de la planta y en la atenuación del estrés causado por el nematodo. La aplicación de *Azospirillum brasilense* en la rizósfera de plantas de pimiento en presencia de nematodos genera respuestas variables en su capacidad controladora del nematodo.

- La coinoculación de diferentes microorganismos, que individualmente resultan efectivos en el control del nematodo y/o en la promoción directa del crecimiento del pimiento, seleccionando momentos específicos de la fenología del cultivo para su aplicación, resulta alentadora como una estrategia de manejo sustentable para su implementación en los sistemas productivos de la región, siendo la combinación B1BT y B1PL capaz de controlar la población de nematodos en las raíces de pimiento, sin afectar la interacción de la planta con hongos micorrícicos arbusculares y la carga de inóculo de *P. lilacinum* en el suelo.

## 7.2- Perspectivas a futuro.

A fines de complementar y continuar el estudio de la línea de investigación abordada en este trabajo de tesis doctoral, se propone tener en cuenta los siguientes puntos:

- Planificar estrategias de manejo a campo usando los microorganismos en estudio para lograr una efectiva reducción de la población de los nematodos en el CHLP.
- Evaluar cuál es el momento y la estrategia de aplicación más efectiva de *Pleurotus ostreatus* en el cultivo de pimiento, analizando la factibilidad de uso de los residuos derivados del sustrato gastado de producciones comerciales del hongo.
- Analizar el efecto de diferentes variables fisicoquímicas del suelo sobre la persistencia de *Purpureocillium lilacinum* LPSC# 876 y su actividad antagónica contra el nematodo.
- Indagar en los mecanismos involucrados en la interacción entre los antagonistas estudiados, los nematodos y la planta huésped así como su modulación variando las condiciones ambientales, el método y el momento de inoculación y a fin de diseñar programas de manejo adecuados que consigan disminuir la densidad de población de *N. aberrans* en el CHLP y mejorar la sanidad y el rendimiento del pimiento.

## ANEXO

### Capítulo 2:

Cuadro 2.1: Análisis de la Varianza para Clorofila (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2726,14	1	2726,14	29,21	0,0003
Trat	2726,14	1	2726,14	29,21	0,0003
Error	933,27	10	93,33		
Total	3659,41	11			

CV: 22,68

Cuadro 2.2: Análisis de la Varianza para Proteínas de hoja (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	92,54	1	92,54	63,15	<0,0001
Trat	92,54	1	92,54	63,15	<0,0001
Error	14,65	10	1,47		
Total	107,19	11			

CV: 15,29

Cuadro 2.3: Análisis de la Varianza para proteínas de raíz (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,39	1	1,39	4,81	0,0530
Trat	1,39	1	1,39	4,81	0,0530
Error	2,90	10	0,29		
Total	4,29	11			

CV: 22,84

Cuadro 2.4: Análisis de la Varianza para Conductividad Relativa de Hojas (CRH) (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1196,89	1	1196,89	278,44	<0,0001
Trat	1196,89	1	1196,89	278,44	<0,0001
Error	42,99	10	4,30		
Total	1239,88	11			

Cuadro 2.5: Análisis de la Varianza para Conductividad Relativa de Raíces (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	188,26	1	188,26	42,32	0,0001
Trat	188,26	1	188,26	42,32	0,0001
Error	44,49	10	4,45		
Total	232,74	11			

CV: 5,36

Cuadro 2.6: Análisis de la Varianza para contenido de prolina en hojas (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	48,97	1	48,97	12,90	0,0049
Trat	48,97	1	48,97	12,90	0,0049

Error	37,96	10	3,80
Total	86,93	11	

CV: 12,27

Cuadro 2.7: Análisis de la Varianza para contenido de prolina en raíces (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14,69	1	14,69	4,67	0,0049
Trat	14,69	1	14,69	4,67	0,0049
Error	31,43	10	3,14		
Total	46,12	11			

CV: 27,44

Cuadro 2.8: Análisis de la Varianza para contenido de prolina en raíces (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	238704,81	1	238704,81	7,29	0,0271
Tratamiento	238704,81	1	238704,81	7,29	0,0271
Error	262056,55	10	32757,07		
Total	500761,37	11			

CV: 8,73

Cuadro 2.9: Análisis de la Varianza para contenido de compuestos fenólicos en hojas (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,61	1	0,61	3,65	0,0852
Trat	0,61	1	0,61	3,65	0,0852
Error	1,68	10	0,17		
Total	2,30	11			

CV: 16,04

Cuadro 2.10: Análisis de la Varianza para contenido de compuestos fenólicos en raíces (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,1E-03	1	4,1E-03	1,12	0,3138
Trat	4,1E-03	1	4,1E-03	1,12	0,3138
Error	0,04	10	3,6E-03		
Total	0,04	11			

CV: 16,50

Cuadro 2.11: Análisis de la Varianza para contenido de MDA en hojas (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7,66	1	7,66	59,31	<0,0001
Trat	7,66	1	7,66	59,31	<0,0001
Error	1,29	10	0,13		
Total	8,96	11			

CV: 12,14

Cuadro 2.12: Análisis de la Varianza para contenido de MDA en raíces (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,80	1	0,80	22,02	0,0009
Trat	0,80	1	0,80	22,02	0,0009
Error	0,36	10	0,04		

Total 1,17 11

CV: 5,44

Cuadro 2.13: Análisis de la Varianza para diámetro del tallo (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,04	1	0,04	2,24	0,1690
Tratamiento	0,04	1	0,04	2,24	0,1690
Error	0,17	9	0,02		
Total	0,21	10			

CV: 16,49

Cuadro 2.14: Análisis de la Varianza para altura final (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	75,01	1	75,01	1,18	0,3062
Tratamiento	75,01	1	75,01	1,18	0,3062
Error	573,71	10	63,75		
Total	648,73	11			

CV: 17,96

Cuadro 2.15: Análisis de la Varianza para PN (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	149,60	1	149,60	10,37	0,0146
Tratamiento	149,60	1	149,60	10,37	0,0146
Error	100,96	9	14,24		
Total	250,56	10			

CV: 12,41

Cuadro 2.16: Análisis de la Varianza para T (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,52800	1	3,52800	17,7414	0,003976
Tratamiento	3,52800	1	3,52800	17,7414	0,003976
Error	1,39200	9	0,19886		
Total	4,92000	10			

CV: 12,14

Cuadro 2.17: Análisis de la Varianza para T (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	26718,1	1	26718,1	17,8632	0,003905
Tratamiento	26718,1	1	26718,1	17,8632	0,003905
Error	10470,0	9	1495,7		
Total	63906,2	10			

CV: 16,50

### Capítulo 3:

Cuadro 3.1: Análisis de la Varianza para el contenido de clorofila (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	338.867471	112.955824	1.994	0.1347
NEMATODOS	1	11547.787257	11547.787257	203.831	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	382.506587	127.502196	2.251	0.1014
Erro	32	1812.919478	56.653734		

Total corregido 39 14082.080794

CV (%) = 21.25

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	3333.806177	3333.806177	58.845	0.0000
NEMATODOS /2	1	1374.220550	1374.220550	24.256	0.0000
NEMATODOS /3	1	3358.303452	3358.303452	59.278	0.0000
NEMATODOS /4	1	3863.963666	3863.963666	68.203	0.0000
Erro	32	1812.919478	56.653734		

- 1 = A2
- 2 = B1
- 3 = Control
- 4 = Mosseae

Cuadro 3.2: Análisis de la Varianza para el contenido de proteínas en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	25.329135	8.443045	17.502	0.0000
NEMATODOS	1	51.505555	51.505555	106.765	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	9.756939	3.252313	6.742	0.0012
Erro	32	15.437381	0.482418		

Total corregido 39 102.029010

CV (%) = 14.93

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	12.762503	12.762503	26.455	0.0000
NEMATODOS /2	1	5.892328	5.892328	12.214	0.0014
NEMATODOS /3	1	37.712184	37.712184	78.173	0.0000
NEMATODOS /4	1	4.895480	4.895480	10.148	0.0032
Erro	32	15.437381	0.482418		

- 1 = A2
- 2 = B1
- 3 = Control
- 4 = Mosseae

Cuadro 3.3: Análisis de la Varianza para el contenido de proteínas en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	3.629331	1.209777	34.959	0.0000
NEMATODOS	1	0.071067	0.071067	2.054	0.1615
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	0.414659	0.138220	3.994	0.0159
Erro	32	1.107368	0.034605		

Total corregido 39 5.222425

CV (%) = 19.88

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.397055	0.397055	11.474	0.0019
NEMATODOS /2	1	0.041232	0.041232	1.192	0.2832
NEMATODOS /3	1	0.013254	0.013254	0.383	0.5404
NEMATODOS /4	1	0.034184	0.034184	0.988	0.3277
Erro	32	1.107368	0.034605		

- 1 = A2
- 2 = B1
- 3 = Control
- 4 = Mosseae

Cuadro 3.4: Análisis de la varianza para el contenido de azúcares reductores en hojas

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIEN	3	14.302466	4.767489	9.907	0.0001
NEMATODOS	1	2.845689	2.845689	5.913	0.0208
TRATAMIEN*NEMATODOS	3	2.932095	0.977365	2.031	0.1292
Erro	32	15.399220	0.481226		
Total corregido	39	35.479470			

CV (%) = 16.39

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.003398	0.003398	0.007	0.9336
NEMATODOS /2	1	0.948229	0.948229	1.970	0.1700
NEMATODOS /3	1	4.748129	4.748129	9.867	0.0036
NEMATODOS /4	1	0.078028	0.078028	0.162	0.6899
Erro	32	15.399220	0.481226		

- 1 = A2
- 2 = B1
- 3 = Control
- 4 = Mosseae

Cuadro 3.5: Análisis de la Varianza para el contenido de azúcares totales (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIEN	3	36.588493	12.196164	11.178	0.0000
NEMATODOS	1	46.198738	46.198738	42.341	0.0000
TRATAMIEN*NEMATODOS	3	28.951858	9.650619	8.845	0.0002
Erro	32	34.915633	1.091114		
Total corregido	39	146.654722			

CV (%) = 19.11

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	4.017785	4.017785	3.682	0.0640
NEMATODOS /2	1	3.387938	3.387938	3.105	0.0876
NEMATODOS /3	1	64.873788	64.873788	59.456	0.0000
NEMATODOS /4	1	2.871084	2.871084	2.631	0.1146
Erro	32	34.915633	1.091114		

- 1= A2
- 2= B1
- 3= Control
- 4= Mosseae

Cuadro 3.6: Análisis de la Varianza para conductividad relativa de membranas de hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIEN	3	7.504901	2.501634	0.297	0.8276
NEMATODOS	1	183.078246	183.078246	21.713	0.0001
TRATAMIEN*NEMATODOS	3	201.214250	67.071417	7.955	0.0004
Erro	32	269.814968	8.431718		
Total corregido	39	661.612365			

CV (%) = 10.21

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	335.652194	335.652194	39.808	0.0000
NEMATODOS /2	1	0.304738	0.304738	0.036	0.8504
NEMATODOS /3	1	9.241395	9.241395	1.096	0.3030
NEMATODOS /4	1	39.094169	39.094169	4.637	0.0389
Erro	32	269.814968	8.431718		

1= A2  
2= B1  
3= Control  
4= Mosseae

Cuadro 3.7: Análisis de la Varianza para conductividad relativa de membranas de hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	1384.051829	461.350610	38.172	0.0000
NEMATODOS	1	1214.806956	1214.806956	100.513	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	668.573936	222.857979	18.439	0.0000
Erro	32	386.754199	12.086069		

Total corregido 39 3654.186921

CV (%) = 21.40

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	115.133415	115.133415	9.526	0.0042
NEMATODOS /2	1	103.400669	103.400669	8.555	0.0063
NEMATODOS /3	1	81.278340	81.278340	6.725	0.0142
NEMATODOS /4	1	1583.568468	1583.568468	131.024	0.0000
Erro	32	386.754199	12.086069		

1= A2  
2= B1  
3= Control  
4= Mosseae

Cuadro 3.8: Análisis de la Varianza para contenido de MDA en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	34.313190	11.437730	8.488	0.0003
NEMATODOS	1	63.935569	63.935569	47.447	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	5.238522	1.746174	1.296	0.2927
Erro	32	43.120754	1.347524		

Total corregido 39 146.608035

CV (%) = 12.21

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	24.730099	24.730099	18.352	0.0002
NEMATODOS /2	1	4.679001	4.679001	3.472	0.0716
NEMATODOS /3	1	15.232337	15.232337	11.304	0.0020
NEMATODOS /4	1	24.532654	24.532654	18.206	0.0002
Erro	32	43.120754	1.347524		

1= A2  
2= B1  
3= Control  
4= Mosseae

Cuadro 3.9: Análisis de la Varianza para contenido de MDA en raíces

(SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	0.262512	0.087504	13.343	0.0000
NEMATODOS	1	0.013170	0.013170	2.008	0.1661
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	0.180566	0.060189	9.178	0.0001
Erro	32	0.209851	0.006558		
Total corregido	39	0.666099			

CV (%) = 9.08

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.078694	0.078694	12.000	0.0015
NEMATODOS /2	1	0.001156	0.001156	0.176	0.6774
NEMATODOS /3	1	0.048850	0.048850	7.449	0.0102
NEMATODOS /4	1	0.065036	0.065036	9.917	0.0035
Erro	32	0.209851	0.006558		

1= A2  
2= B1  
3= Control  
4= Mosseae

Cuadro 3.10: Análisis de la Varianza para el contenido de compuestos fenólicos en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	0.055590	0.018530	7.171	0.0008
NEMATODOS	1	0.023116	0.023116	8.945	0.0053
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	0.066374	0.022125	8.562	0.0002
Erro	32	0.082693	0.002584		
Total corregido	39	0.227773			

CV (%) = 24.83

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.002092	0.002092	0.810	0.3749
NEMATODOS /2	1	0.000894	0.000894	0.346	0.5605
NEMATODOS /3	1	0.086470	0.086470	33.462	0.0000
NEMATODOS /4	1	0.000034	0.000034	0.013	0.9096
Erro	32	0.082693	0.002584		

1= A2  
2= B1  
3= Control  
4= Mosseae

Cuadro 3.11: Análisis de la Varianza para el contenido de compuestos fenólicos en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	0.427464	0.142488	6.075	0.0021
NEMATODOS	1	0.166186	0.166186	7.085	0.0121
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	0.751719	0.250573	10.683	0.0000
Erro	32	0.750575	0.023455		
Total corregido	39	2.095944			

CV (%) = 8.70

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
----	----	----	----	----	-------

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.071707	0.071707	3.057	0.0900
NEMATODOS /2	1	0.024311	0.024311	1.036	0.3163
NEMATODOS /3	1	0.821453	0.821453	35.022	0.0000
NEMATODOS /4	1	0.000434	0.000434	0.019	0.8926
Erro	32	0.750575	0.023455		

1= A2  
2= B1  
3= Control  
4= Mosseae

Cuadro 3.12: Análisis de la Varianza para el contenido de prolina en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	214.182500	71.394167	10.842	0.0000
NEMATODOS	1	613.929459	613.929459	93.231	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	279.785103	93.261701	14.163	0.0000
Erro	32	210.721924	6.585060		

Total corregido 39 1318.618986

CV (%) = 26.66

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	177.220345	177.220345	26.912	0.0000
NEMATODOS /2	1	0.086251	0.086251	0.013	0.9096
NEMATODOS /3	1	145.163419	145.163419	22.044	0.0000
NEMATODOS /4	1	571.244546	571.244546	86.749	0.0000
Erro	32	210.721924	6.585060		

1 = A2  
2 = B1  
3 = Control  
4 = Mosseae

Cuadro 3.13: Análisis de la Varianza para número de huevos totales (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	14878827.982040	4959609.327347	32.748	0.0000
Erro	16	2423141.602880	151446.350180		

Total corregido 19 17301969.584920

CV (%) = 38.95

Cuadro 3.14: Análisis de la Varianza para el Factor de reproducción (FR) (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	806.375580	268.791860	8.400	0.0014
Erro	16	512.000040	32.000002		

Total corregido 19 1318.375620

CV (%) = 12.25

Cuadro 3.15: Análisis de la Varianza para número de huevos totales/gramo (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
----	----	----	----	----	-------

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	1.037773183E+0011	3.45924394E+0010	88.842	0.0000
Erro	16	6.229916667E+0009	389369791.666668		
Total corregido	19	1.100072349E+0011			

CV (%) = 34.45

Capítulo 4:

Cuadro 4.1: Análisis de la Varianza para número de huevos totales (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	11069980.063081	5534990.031541	25.221	0.0001
Erro	12	2633475.181232	219456.265103		
Total corregido	14	13703455.244313			

CV (%) = 30.30

Cuadro 4.2: Análisis de la Varianza para Factor de Reproducción (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	2281.319444	1140.659722	4.945	0.0271
erro	12	2768.083333	230.673611		
Total corregido	14	5049.402778			

CV (%) = 25.07

Cuadro 4.3: Análisis de la Varianza para el contenido de Clorofila (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	295.324547	147.662273	2.880	0.0757
NEMATODOS	1	4570.415593	4570.415593	89.152	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS	2	568.475579	284.237790	5.544	0.0105
Erro	24	1230.369887	51.265412		
Total corregido	29	6664.585606			

CV (%) = 20.15

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	3358.303452	3358.303452	65.508	0.0000
NEMATODOS /2	1	655.305516	655.305516	12.783	0.0015
NEMATODOS /3	1	1125.282204	1125.282204	21.950	0.0001
Erro	24	1230.369887	51.265412		

- 1 = Control
- 2 = *P. lilacinum*
- 3 = *P. ostreatus*

Cuadro 4.4: Análisis de la Varianza para el contenido de Proteínas foliares (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	39.010507	19.505254	19.043	0.0000
NEMATODOS	1	16.831216	16.831216	16.432	0.0005

TRATAMIENT*NEMATODOS	2	31.720329	15.860165	15.484	0.0000
Erro	24	24.582626	1.024276		
-----					
Total corregido	29	112.144678			
-----					

CV (%) = 16.54

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	37.712184	37.712184	36.818	0.0000
NEMATODOS /2	1	7.617144	7.617144	7.437	0.0118
NEMATODOS /3	1	3.222218	3.222218	3.146	0.0888
Erro	24	24.582626	1.024276		

1= Control  
2= *P. lilacinum*  
3= *P. ostreatus*

Cuadro 4.5: Análisis de la Varianza para el contenido de Proteínas en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	0.123841	0.061920	1.730	0.1987
NEMATODOS	1	0.743930	0.743930	20.783	0.0001
TRATAMIENT*NEMATODOS	2	0.604551	0.302275	8.445	0.0017
Erro	24	0.859085	0.035795		
-----					
Total corregido	29	2.331406			
-----					

CV (%) = 19.54

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.013254	0.013254	0.370	0.5486
NEMATODOS /2	1	0.438037	0.438037	12.237	0.0019
NEMATODOS /3	1	0.897190	0.897190	25.065	0.0000
Erro	24	0.859085	0.035795		

1= Control  
2= *P. lilacinum*  
3= *P. ostreatus*

Cuadro 4.6: Análisis de la Varianza para el contenido de Azúcares reductores (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	8.552722	4.276361	46.400	0.0000
NEMATODOS	1	1.490421	1.490421	16.172	0.0005
TRATAMIENT*NEMATODOS	2	3.875587	1.937794	21.026	0.0000
Erro	24	2.211911	0.092163		
-----					
Total corregido	29	16.130641			
-----					

CV (%) = 7.06

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	4.748129	4.748129	51.519	0.0000
NEMATODOS /2	1	0.273158	0.273158	2.964	0.0980
NEMATODOS /3	1	0.344721	0.344721	3.740	0.0650
Erro	24	2.211911	0.092163		

1= Control  
2= *P. lilacinum*  
3= *P. ostreatus*

Cuadro 4.7: Análisis de la Varianza para el contenido de Azúcares Totales (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	54.954615	27.477308	50.762	0.0000
NEMATODOS	1	27.759344	27.759344	51.283	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS	2	38.606897	19.303449	35.661	0.0000
Erro	24	12.991127	0.541297		
Total corregido	29	134.311984			

CV (%)= 13.50

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	64.873788	64.873788	119.849	0.0000
NEMATODOS /2	1	0.020196	0.020196	0.037	0.8485
NEMATODOS /3	1	1.472257	1.472257	2.720	0.1121
Erro	24	12.991127	0.541297		

1= Control  
2= *P. lilacinum*  
3= *P. ostreatus*

Cuadro 4.8: Análisis de la Varianza para la conductividad relativa de membranas en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	166.942469	83.471234	12.891	0.0002
NEMATODOS	1	124.471700	124.471700	19.223	0.0002
TRATAMIENT*NEMATODOS	2	25.690669	12.845334	1.984	0.1595
Erro	24	155.404528	6.475189		
Total corregido	29	472.509365			

CV (%)= 9.87

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	9.241395	9.241395	1.427	0.2439
NEMATODOS /2	1	37.213855	37.213855	5.747	0.0247
NEMATODOS /3	1	103.707119	103.707119	16.016	0.0005
Erro	24	155.404528	6.475189		

1= Control  
2= *P. lilacinum*  
3= *P. ostreatus*

Cuadro 4.9: Análisis de la Varianza para la conductividad relativa de membranas en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	946.990867	473.495434	40.651	0.0000
NEMATODOS	1	18.043262	18.043262	1.549	0.2253
TRATAMIENT*NEMATODOS	2	65.452200	32.726100	2.810	0.0801
Erro	24	279.548623	11.647859		
Total corregido	29	1310.034953			

CV (%)= 24.00

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	81.278340	81.278340	6.978	0.0143
NEMATODOS /2	1	0.032431	0.032431	0.003	0.9584

NEMATODOS	/3	1	2.184691	2.184691	0.188	0.6688
Erro		24	279.548623	11.647859		

1 = Control  
2 = *P. lilacinum*  
3 = *P. ostreatus*

Cuadro 4.10: Análisis de la Varianza para el contenido de prolina en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	194.013596	97.006798	56.354	0.0000
NEMATODOS	1	26.128221	26.128221	15.178	0.0007
TRATAMIENT*NEMATODOS	2	127.759289	63.879645	37.109	0.0000
Erro	24	41.313524	1.721397		

Total corregido 29 389.214631

CV (%) = 21.47

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
NEMATODOS	/1	1	145.163419	145.163419	84.329	0.0000
NEMATODOS	/2	1	0.063493	0.063493	0.037	0.8493
NEMATODOS	/3	1	8.660599	8.660599	5.031	0.0344
Erro	24	41.313524	1.721397			

1= Control  
2= *P. lilacinum*  
3= *P. ostreatus*

Cuadro 4.11: Análisis de la Varianza para el contenido de prolina en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	6.784666	3.392333	7.863	0.0024
NEMATODOS	1	0.008198	0.008198	0.019	0.8915
TRATAMIENT*NEMATODOS	2	14.491147	7.245573	16.795	0.0000
Erro	24	10.353882	0.431412		

Total corregido 29 31.637893

CV (%) = 25.15

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
NEMATODOS	/1	1	9.019696	9.019696	20.907	0.0001
NEMATODOS	/2	1	5.145448	5.145448	11.927	0.0021
NEMATODOS	/3	1	0.334201	0.334201	0.775	0.3875
Erro	24	10.353882	0.431412			

1= Control  
2= *P. lilacinum*  
3= *P. ostreatus*

Cuadro 4.12: Análisis de la Varianza para el contenido de MDA en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	1.679145	0.839572	1.609	0.2210
NEMATODOS	1	0.038772	0.038772	0.074	0.7875
TRATAMIENT*NEMATODOS	2	21.597557	10.798779	20.691	0.0000
Erro	24	12.525736	0.521906		

Total corregido 29 35.841210

CV (%) = 8.60

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	15.232337	15.232337	29.186	0.0000
NEMATODOS /2	1	3.822696	3.822696	7.324	0.0123
NEMATODOS /3	1	2.581296	2.581296	4.946	0.0358
Erro	24	12.525736	0.521906		

1= Control  
2= *P. lilacinum*  
3= *P. ostreatus*

Cuadro 4.13: Análisis de la Varianza para el contenido de MDA en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	0.358023	0.179011	17.882	0.0000
NEMATODOS	1	0.001284	0.001284	0.128	0.7234
TRATAMIENT*NEMATODOS	2	0.062690	0.031345	3.131	0.0619
Erro	24	0.240253	0.010011		

Total corregido 29 0.662249

CV (%) = 10.73

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.048850	0.048850	4.880	0.0370
NEMATODOS /2	1	0.001954	0.001954	0.195	0.6626
NEMATODOS /3	1	0.013170	0.013170	1.316	0.2627
Erro	24	0.240253	0.010011		

1= Control  
2= *P. lilacinum*  
3= *P. ostreatus*

Cuadro 4.14: Análisis de la Varianza para el contenido de compuestos fenólicos en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	0.334557	0.167279	5.341	0.0121
NEMATODOS	1	0.101893	0.101893	3.253	0.0839
TRATAMIENT*NEMATODOS	2	0.922006	0.461003	14.719	0.0001
Erro	24	0.751709	0.031321		

Total corregido 29 2.110166

CV (%) = 9.97

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.821453	0.821453	26.227	0.0000
NEMATODOS /2	1	0.007714	0.007714	0.246	0.6242
NEMATODOS /3	1	0.194733	0.194733	6.217	0.0199
Erro	24	0.751709	0.031321		

1 = Control  
2 = *P. lilacinum*  
3 = *P. ostreatus*

Cuadro 4.15: Análisis de la Varianza para el contenido de compuestos fenólicos en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
----	----	----	----	----	-------

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	2	0.027008	0.013504	3.292	0.0545
NEMATODOS	1	0.370507	0.370507	90.319	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS	2	0.006077	0.003039	0.741	0.4874
Erro	24	0.098453	0.004102		

Total corregido 29 0.502046

CV (%) = 22.06

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.086470	0.086470	21.079	0.0001
NEMATODOS /2	1	0.163206	0.163206	39.785	0.0000
NEMATODOS /3	1	0.126909	0.126909	30.937	0.0000
Erro	24	0.098453	0.004102		

1= Control  
2= *P. lilacinum*  
3= *P. ostreatus*

### Capítulo 6:

Cuadro 5.1: Análisis de la Varianza para el contenido de clorofila (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	50.232142	16.744047	0.437	0.7276
NEMATODOS	1	174.879675	174.879675	4.565	0.0388
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	1031.645875	343.881958	8.976	0.0001
Erro	40	1532.371300	38.309282		

Total corregido 47 2789.128992

CV (%) = 7.67

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	41.107008	41.107008	1.073	0.3065
NEMATODOS /2	1	1.104133	1.104133	0.029	0.8660
NEMATODOS /3	1	0.044408	0.044408	0.001	0.9730
NEMATODOS /4	1	1164.270000	1164.270000	30.391	0.0000
Erro	40	1532.371300	38.309282		

1= *Azospirillum*  
2= *B. subtilis*  
3= *B. thuring*  
4= Control

Cuadro 5.2: Análisis de la Varianza para el contenido de carotenos (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	1.950375	0.650125	0.410	0.7467
NEMATODOS	1	1.591408	1.591408	1.003	0.3226
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	12.193842	4.064614	2.562	0.0683
Erro	40	63.451167	1.586279		

Total corregido 47 79.186792

CV (%) = 10.48

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.118008	0.118008	0.074	0.7864
NEMATODOS /2	1	0.040833	0.040833	0.026	0.8733
NEMATODOS /3	1	0.333333	0.333333	0.210	0.6491

NEMATODOS	/4	1	13.293075	13.293075	8.380	0.0061
Erro		40	63.451167	1.586279		

1= Azospirillum  
2= B. subtilis  
3= B. thuring  
4= Control

Cuadro 5.3: Análisis de la Varianza para el contenido de proteínas foliares (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	7.465356	2.488452	0.836	0.4820
NEMATODOS	1	7.418269	7.418269	2.493	0.1223
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	93.740523	31.246841	10.500	0.0000
Erro	40	119.040950	2.976024		

Total corregido 47 227.665098

CV (%) = 7.70

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
NEMATODOS	/1	1	0.676875	0.676875	0.227	0.6360
NEMATODOS	/2	1	21.520408	21.520408	7.231	0.0104
NEMATODOS	/3	1	5.454008	5.454008	1.833	0.1834
NEMATODOS	/4	1	73.507500	73.507500	24.700	0.0000
Erro	40	119.040950	2.976024			

1= Azospirillum  
2= B. subtilis  
3= B. thuring  
4= Control

Cuadro 5.4: Análisis de la Varianza para el contenido de proteínas en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	0.635273	0.211758	2.656	0.0614
NEMATODOS	1	0.632502	0.632502	7.933	0.0075
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	1.598656	0.532885	6.684	0.0009
Erro	40	3.189050	0.079726		

Total corregido 47 6.055481

CV (%) = 13.26

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
NEMATODOS	/1	1	0.323408	0.323408	4.056	0.0508
NEMATODOS	/2	1	0.350208	0.350208	4.393	0.0425
NEMATODOS	/3	1	1.414533	1.414533	17.742	0.0001
NEMATODOS	/4	1	0.143008	0.143008	1.794	0.1880
Erro	40	3.189050	0.079726			

1= Azospirillum  
2= B. subtilis  
3= B. thuring  
4= Control

Cuadro 5.5: Análisis de la Varianza para conductividad relativa de membranas en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	201.017540	67.005847	11.078	0.0000
NEMATODOS	1	275.472919	275.472919	45.545	0.0000

TRATAMIENT*NEMATODOS	3	129.755873	43.251958	7.151	0.0006
Erro	40	241.932217	6.048305		
-----					
Total corregido	47	848.178548			
-----					

CV (%)= 7.46

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS	/1	1	27.785633	27.785633	4.594	0.0382
NEMATODOS	/2	1	12.301875	12.301875	2.034	0.1616
NEMATODOS	/3	1	41.181075	41.181075	6.809	0.0127
NEMATODOS	/4	1	323.960208	323.960208	53.562	0.0000
Erro		40	241.932217	6.048305		

1= Azospirillum  
2= B. subtilis  
3= B. thuring  
4= Control

Cuadro 5.6: Análisis de la Varianza para conductividad relativa de membranas en raíces (SC tipo III).

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT		3	483.023675	161.007892	9.010	0.0001
NEMATODOS		1	1291.272533	1291.272533	72.259	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS		3	318.132150	106.044050	5.934	0.0019
Erro		40	714.804767	17.870119		
-----						
Total corregido		47	2807.233125			
-----						

CV (%)= 12.92

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS	/1	1	8.316675	8.316675	0.465	0.4990
NEMATODOS	/2	1	577.408133	577.408133	32.311	0.0000
NEMATODOS	/3	1	396.405075	396.405075	22.183	0.0000
NEMATODOS	/4	1	627.274800	627.274800	35.102	0.0000
Erro		40	714.804767	17.870119		

1= Azospirillum  
2= B. subtilis  
3= B. thuring  
4= Control

Cuadro 5.7: Análisis de la Varianza para el contenido de prolina en hojas (SC tipo III).

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT		3	13530.871908	4510.290636	12.743	0.0000
NEMATODOS		1	19386.048533	19386.048533	54.771	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS		3	16098.347250	5366.115750	15.161	0.0000
Erro		40	14158.002500	353.950062		
-----						
Total corregido		47	63173.270192			
-----						

CV (%)= 16.16

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS	/1	1	89.653333	89.653333	0.253	0.6175
NEMATODOS	/2	1	922.779408	922.779408	2.607	0.1142
NEMATODOS	/3	1	4164.177633	4164.177633	11.765	0.0014
NEMATODOS	/4	1	30307.785408	30307.785408	85.627	0.0000
Erro		40	14158.002500	353.950062		

1= Azospirillum

2= *B. subtilis*  
3= *B. thuring*  
4= Control

Cuadro 5.8: Análisis de la Varianza para el contenido de prolina en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	2922.306023	974.102008	12.843	0.0000
NEMATODOS	1	772.406302	772.406302	10.184	0.0028
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	1512.373073	504.124358	6.647	0.0009
Erro	40	3033.909850	75.847746		
Total corregido	47	8240.995248			

CV (%)= 16.16

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	8.875200	8.875200	0.117	0.7341
NEMATODOS /2	1	172.672533	172.672533	2.277	0.1392
NEMATODOS /3	1	0.190008	0.190008	0.003	0.9603
NEMATODOS /4	1	2103.041633	2103.041633	27.727	0.0000
Erro	40	3033.909850	75.847746		

1= *Azospirillum*  
2= *B. subtilis*  
3= *B. thuring*  
4= Control

Cuadro 5.9: Análisis de la Varianza para el contenido de azúcares totales en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	2.089342	0.696447	5.477	0.0030
NEMATODOS	1	25.550008	25.550008	200.936	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	1.880175	0.626725	4.929	0.0052
Erro	40	5.086200	0.127155		
Total corregido	47	34.605725			

CV (%)= 17.75

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	12.040033	12.040033	94.688	0.0000
NEMATODOS /2	1	2.774408	2.774408	21.819	0.0000
NEMATODOS /3	1	4.563333	4.563333	35.888	0.0000
NEMATODOS /4	1	8.052408	8.052408	63.328	0.0000
Erro	40	5.086200	0.127155		

1= *Azospirillum*  
2= *B. subtilis*  
3= *B. thuring*  
4= Control

Cuadro 5.10: Análisis de la Varianza para el contenido de azúcares totales en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	10.180417	3.393472	11.983	0.0000
NEMATODOS	1	1.512300	1.512300	5.340	0.0261
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	32.914450	10.971483	38.742	0.0000
Erro	40	11.327700	0.283192		
Total corregido	47	55.934867			

CV (%)= 17.15

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	14.476033	14.476033	51.117	0.0000
NEMATODOS /2	1	3.910208	3.910208	13.808	0.0006
NEMATODOS /3	1	0.399675	0.399675	1.411	0.2418
NEMATODOS /4	1	15.640833	15.640833	55.230	0.0000
Erro	40	11.327700	0.283192		

1= Azospirillum  
2= B. subtilis  
3= B. thuring  
4= Control

Cuadro 5.11: Análisis de la Varianza para el contenido de azúcares reductores en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	1.310050	0.436683	11.725	0.0000
NEMATODOS	1	5.644408	5.644408	151.555	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	0.115875	0.038625	1.037	0.3865
Erro	40	1.489733	0.037243		
Total corregido	47	8.560067			

CV (%)= 15.80

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	1.062075	1.062075	28.517	0.0000
NEMATODOS /2	1	1.080000	1.080000	28.998	0.0000
NEMATODOS /3	1	1.526533	1.526533	40.988	0.0000
NEMATODOS /4	1	2.091675	2.091675	56.162	0.0000
Erro	40	1.489733	0.037243		

1= Azospirillum  
2= B. subtilis  
3= B. thuring  
4= Control

Cuadro 5.12: Análisis de la Varianza para el contenido de azúcares reductores en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	0.374242	0.124747	15.903	0.0000
NEMATODOS	1	0.053333	0.053333	6.799	0.0128
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	1.096050	0.365350	46.576	0.0000
Erro	40	0.313767	0.007844		
Total corregido	47	1.837392			

CV (%)= 20.74

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.112133	0.112133	14.295	0.0005
NEMATODOS /2	1	0.007500	0.007500	0.956	0.3340
NEMATODOS /3	1	0.072075	0.072075	9.188	0.0043
NEMATODOS /4	1	0.957675	0.957675	122.088	0.0000
Erro	40	0.313767	0.007844		

1= Azospirillum  
2= B. subtilis  
3= B. thuring  
4= Control

Cuadro 5.13: Análisis de la Varianza para el contenido de MDA en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	14.113406	4.704469	7.960	0.0003
NEMATODOS	1	0.105469	0.105469	0.178	0.6750
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	7.678523	2.559508	4.331	0.0098
Erro	40	23.639650	0.590991		
Total corregido	47	45.537048			

CV (%)= 9.54

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.440833	0.440833	0.746	0.3929
NEMATODOS /2	1	3.339075	3.339075	5.650	0.0223
NEMATODOS /3	1	2.717008	2.717008	4.597	0.0382
NEMATODOS /4	1	1.287075	1.287075	2.178	0.1478
Erro	40	23.639650	0.590991		

1= Azospirillum  
 2= B. subtilis  
 3= B. thuring  
 4= Control

Cuadro 5.14: Análisis de la Varianza para el contenido de MDA en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	8.971990	2.990663	12.005	0.0000
NEMATODOS	1	2.525419	2.525419	10.137	0.0028
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	4.083323	1.361108	5.464	0.0030
Erro	40	9.964917	0.249123		
Total corregido	47	25.545648			

CV (%)= 15.51

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEMATODOS /1	1	0.018408	0.018408	0.074	0.7871
NEMATODOS /2	1	0.006533	0.006533	0.026	0.8722
NEMATODOS /3	1	5.467500	5.467500	21.947	0.0000
NEMATODOS /4	1	1.116300	1.116300	4.481	0.0405
Erro	40	9.964917	0.249123		

1= Azospirillum  
 2= B. subtilis  
 3= B. thuring  
 4= Control

Cuadro 5.15: Análisis de la Varianza para el contenido de compuestos fenólicos en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	1.789756	0.596585	12.534	0.0000
NEMATODOS	1	0.299252	0.299252	6.287	0.0163
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	1.099190	0.366397	7.698	0.0003
Erro	40	1.903883	0.047597		
Total corregido	47	5.092081			

CV (%)= 10.19

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
----	----	----	----	----	-------

NEMATODOS	/1	1	0.003333	0.003333	0.070	0.7926
NEMATODOS	/2	1	0.158700	0.158700	3.334	0.0753
NEMATODOS	/3	1	0.156408	0.156408	3.286	0.0774
NEMATODOS	/4	1	1.080000	1.080000	22.690	0.0000
Erro		40	1.903883	0.047597		

1= Azospirillum  
2= B. subtilis  
3= B. thuring  
4= Control

Cuadro 5.16: Análisis de la Varianza para el contenido de compuestos fenólicos en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENT	3	0.007575	0.002525	0.675	0.5722
NEMATODOS	1	0.102675	0.102675	27.465	0.0000
TRATAMIENT*NEMATODOS	3	0.009608	0.003203	0.857	0.4714
Erro	40	0.149533	0.003738		

Total corregido 47 0.269392

CV (%)= 20.07

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
NEMATODOS	/1	1	0.013333	0.013333	3.567	0.0662
NEMATODOS	/2	1	0.026133	0.026133	6.991	0.0116
NEMATODOS	/3	1	0.015408	0.015408	4.122	0.0490
NEMATODOS	/4	1	0.057408	0.057408	15.357	0.0003
Erro	40	0.149533	0.003738			

1= Azospirillum  
2= B. subtilis  
3= B. thuring  
4= Control

## Capítulo 6:

Cuadro 6.1: Análisis de la Varianza para altura total (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	339.482160	48.497451	1.782	0.1064
NEM	1	98.479220	98.479220	3.618	0.0617
TRAT*NEM	7	323.864160	46.266309	1.700	0.1250
Erro	64	1742.125040	27.220704		

Total corregido 79 2503.950580

CV (%)= 10.69

Cuadro 6.2: Análisis de la Varianza para diametro del tallo (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	0.074340	0.010620	1.915	0.0815
NEM	1	0.004500	0.004500	0.812	0.3710
TRAT*NEM	7	0.048060	0.006866	1.238	0.2955
Erro	64	0.354880	0.005545		

Total corregido 79 0.481780

CV (%)= 9.79

Cuadro 6.3: Análisis de la Varianza para contenido de clorofila 1 (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	350.151315	50.021616	4.503	0.0004
NEM	1	3751.882245	3751.882245	337.752	0.0000
TRAT*NEM	7	237.518195	33.931171	3.055	0.0078
Erro	64	710.936240	11.108379		
Total corregido	79	5050.487995			

CV (%)= 16.91

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEM	/1 1	489.720040	489.720040	44.086	0.0000
NEM	/2 1	489.720040	489.720040	44.086	0.0000
NEM	/3 1	372.100000	372.100000	33.497	0.0000
NEM	/4 1	211.968160	211.968160	19.082	0.0000
NEM	/5 1	263.682250	263.682250	23.737	0.0000
NEM	/6 1	542.726890	542.726890	48.857	0.0000
NEM	/7 1	1146.826810	1146.826810	103.240	0.0000
NEM	/8 1	472.656250	472.656250	42.550	0.0000
Erro	64	710.936240	11.108379		

- 1= B1
- 2= B1BT
- 3= B1BTPL
- 4= B1PL
- 5= BT
- 6= BTPL
- 7= Control
- 8= PL

Cuadro 6.4: Análisis de la Varianza para contenido de clorofila 2 (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	436.331319	62.333046	5.838	0.0001
NEM	1	340.310256	340.310256	31.875	0.0000
TRAT*NEM	7	393.139969	56.162853	5.261	0.0002
Erro	48	512.462900	10.676310		
Total corregido	63	1682.244444			

CV (%)= 14.63

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEM	/1 1	21.027612	21.027612	1.970	0.1669
NEM	/2 1	179.646013	179.646013	16.827	0.0002
NEM	/3 1	59.024112	59.024112	5.529	0.0229
NEM	/4 1	39.917112	39.917112	3.739	0.0591
NEM	/5 1	103.752013	103.752013	9.718	0.0031
NEM	/6 1	1.428050	1.428050	0.134	0.7162
NEM	/7 1	315.005000	315.005000	29.505	0.0000
NEM	/8 1	13.650312	13.650312	1.279	0.2638
Erro	48	512.462900	10.676310		

- 1= B1
- 2= B1BT
- 3= B1BTPL
- 4= B1PL
- 5= BT
- 6= BTPL
- 7= Control
- 8= PL

Cuadro 6.5: Análisis de la Varianza para conductividad relativa de membranas de hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
----	----	----	----	----	-------

TRAT	7	1203.402120	171.914589	6.843	0.0000
NEM	1	3207.031380	3207.031380	127.654	0.0000
TRAT*NEM	7	840.858420	120.122631	4.781	0.0002
Erro	64	1607.859960	25.122812		

Total corregido 79 6859.151880

CV (%)= 13.19

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEM	/1 1	316.631290	316.631290	12.603	0.0007
NEM	/2 1	614.812810	614.812810	24.472	0.0000
NEM	/3 1	176.904360	176.904360	7.042	0.0100
NEM	/4 1	67.236490	67.236490	2.676	0.1068
NEM	/5 1	212.705440	212.705440	8.467	0.0050
NEM	/6 1	590.438560	590.438560	23.502	0.0000
NEM	/7 1	1876.352040	1876.352040	74.687	0.0000
NEM	/8 1	192.808810	192.808810	7.675	0.0073
Erro	64	1607.859960	25.122812		

- 1= B1
- 2= B1BT
- 3= B1BTPL
- 4= B1PL
- 5= BT
- 6= BTPL
- 7= Control
- 8= PL

Cuadro 6.6: Análisis de la Varianza para conductividad relativa de membranas de raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	1304.484600	186.354943	10.801	0.0000
NEM	1	705.909620	705.909620	40.914	0.0000
TRAT*NEM	7	935.899780	133.699969	7.749	0.0000
Erro	64	1104.232200	17.253628		

Total corregido 79 4050.526200

CV (%)= 21.15

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEM	/1 1	5.670090	5.670090	0.329	0.5685
NEM	/2 1	140.550010	140.550010	8.146	0.0058
NEM	/3 1	81.681640	81.681640	4.734	0.0333
NEM	/4 1	9.900250	9.900250	0.574	0.4515
NEM	/5 1	0.088360	0.088360	0.005	0.9432
NEM	/6 1	97.406410	97.406410	5.646	0.0205
NEM	/7 1	1227.664000	1227.664000	71.154	0.0000
NEM	/8 1	78.848640	78.848640	4.570	0.0364
Erro	64	1104.232200	17.253628		

- 1= B1
- 2= B1BT
- 3= B1BTPL
- 4= B1PL
- 5= BT
- 6= BTPL
- 7= Control
- 8= PL

Cuadro 6.7: Análisis de la Varianza para contenido de proteínas foliares (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	20.003023	2.857575	5.603	0.0001

NEM	1	79.588702	79.588702	156.052	0.0000
TRAT*NEM	7	19.312986	2.758998	5.410	0.0001
Erro	48	24.480675	0.510014		

-----  
 Total corregido 63 143.385386  
 -----

CV (%)= 18.67

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEM	/1 1	4.992800	4.992800	9.790	0.0030
NEM	/2 1	37.497800	37.497800	73.523	0.0000
NEM	/3 1	11.858450	11.858450	23.251	0.0000
NEM	/4 1	3.013513	3.013513	5.909	0.0189
NEM	/5 1	22.579200	22.579200	44.272	0.0000
NEM	/6 1	8.590513	8.590513	16.844	0.0002
NEM	/7 1	9.504800	9.504800	18.636	0.0001
NEM	/8 1	0.864612	0.864612	1.695	0.1991
Erro	48	24.480675	0.510014		

- 1= B1  
 2= B1BT  
 3= B1BTPL  
 4= B1PL  
 5= BT  
 6= BTPL  
 7= Control  
 8= PL

Cuadro 6.8: Análisis de la Varianza para contenido de proteínas en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	0.849225	0.121318	6.443	0.0000
NEM	1	0.004225	0.004225	0.224	0.6379
TRAT*NEM	7	1.249575	0.178511	9.481	0.0000
Erro	48	0.903750	0.018828		

-----  
 Total corregido 63 3.006775  
 -----

CV (%)= 18.62

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEM	/1 1	0.000800	0.000800	0.042	0.8376
NEM	/2 1	0.108112	0.108112	5.742	0.0205
NEM	/3 1	0.151250	0.151250	8.033	0.0067
NEM	/4 1	0.165313	0.165313	8.780	0.0047
NEM	/5 1	0.052813	0.052813	2.805	0.1005
NEM	/6 1	0.045000	0.045000	2.390	0.1287
NEM	/7 1	0.720000	0.720000	38.241	0.0000
NEM	/8 1	0.010512	0.010512	0.558	0.4586
Erro	48	0.903750	0.018828		

- 1= B1  
 2= B1BT  
 3= B1BTPL  
 4= B1PL  
 5= BT  
 6= BTPL  
 7= Control  
 8= PL

Cuadro 6.9: Análisis de la Varianza para contenido de proteínas en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	85.530311	12.218616	21.075	0.0000
NEM	1	20.532227	20.532227	35.414	0.0000
TRAT*NEM	7	47.642211	6.806030	11.739	0.0000

Erro	48	27.828925	0.579769
-----			
Total corregido	63	181.533673	
-----			
CV (%)=	15.52		

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEM	/1 1	8.967613	8.967613	15.468	0.0003
NEM	/2 1	4.977013	4.977013	8.584	0.0052
NEM	/3 1	1.065800	1.065800	1.838	0.1815
NEM	/4 1	2.080800	2.080800	3.589	0.0642
NEM	/5 1	31.840200	31.840200	54.919	0.0000
NEM	/6 1	0.414050	0.414050	0.714	0.4023
NEM	/7 1	17.434512	17.434512	30.071	0.0000
NEM	/8 1	1.394450	1.394450	2.405	0.1275
Erro	48	27.828925	0.579769		

- 1= B1
- 2= B1BT
- 3= B1BTPL
- 4= B1PL
- 5= BT
- 6= BTPL
- 7= Control
- 8= PL

Cuadro 6.10: Análisis de la Varianza para contenido de MDA en hojas (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	1.126423	0.160918	7.142	0.0000
NEM	1	0.020664	0.020664	0.917	0.3430
TRAT*NEM	7	1.676323	0.239475	10.629	0.0000
Erro	48	1.081475	0.022531		
-----					
Total corregido	63	3.904886			
-----					
CV (%)=	28.35				

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEM	/1 1	0.195312	0.195312	8.669	0.0050
NEM	/2 1	0.068450	0.068450	3.038	0.0877
NEM	/3 1	0.010513	0.010513	0.467	0.4978
NEM	/4 1	0.040612	0.040612	1.803	0.1857
NEM	/5 1	0.186050	0.186050	8.258	0.0060
NEM	/6 1	0.259200	0.259200	11.504	0.0014
NEM	/7 1	0.732050	0.732050	32.491	0.0000
NEM	/8 1	0.204800	0.204800	9.090	0.0041
Erro	48	1.081475	0.022531		

- 1= B1
- 2= B1BT
- 3= B1BTPL
- 4= B1PL
- 5= BT
- 6= BTPL
- 7= Control
- 8= PL

Cuadro 6.11: Análisis de la Varianza para contenido de MDA en raíces (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	0.397536	0.056791	21.605	0.0000
NEM	1	0.079102	0.079102	30.092	0.0000
TRAT*NEM	7	0.173911	0.024844	9.451	0.0000
Erro	48	0.126175	0.002629		

Total corregido	63	0.776723
-----------------	----	----------

CV (%)= 12.94

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEM	/1 1	0.063013	0.063013	23.971	0.0000
NEM	/2 1	0.001013	0.001013	0.385	0.5378
NEM	/3 1	0.007813	0.007813	2.972	0.0911
NEM	/4 1	0.014450	0.014450	5.497	0.0232
NEM	/5 1	0.063012	0.063012	23.971	0.0000
NEM	/6 1	0.005000	0.005000	1.902	0.1742
NEM	/7 1	0.039200	0.039200	14.913	0.0003
NEM	/8 1	0.059513	0.059513	22.640	0.0000
Erro	48	0.126175	0.002629		

- 1= B1
- 2= B1BT
- 3= B1BTPL
- 4= B1PL
- 5= BT
- 6= BTPL
- 7= Control
- 8= PL

Cuadro 6.12: Análisis de la Varianza para conductancia estomática (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	19048.250419	2721.178631	9.572	0.0000
NEM	1	9145.575056	9145.575056	32.169	0.0000
TRAT*NEM	7	17084.613669	2440.659096	8.585	0.0000
Erro	48	13646.153350	284.294861		
Total corregido	63	58924.592494			

CV (%)= 19.98

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEM	/1 1	720.670613	720.670613	2.535	0.1179
NEM	/2 1	3.645000	3.645000	0.013	0.9103
NEM	/3 1	3933.845000	3933.845000	13.837	0.0005
NEM	/4 1	3353.805000	3353.805000	11.797	0.0012
NEM	/5 1	655.220000	655.220000	2.305	0.1355
NEM	/6 1	4940.180000	4940.180000	17.377	0.0001
NEM	/7 1	11470.823112	11470.823112	40.348	0.0000
NEM	/8 1	1152.000000	1152.000000	4.052	0.0497
Erro	48	13646.153350	284.294861		

- 1= B1
- 2= B1BT
- 3= B1BTPL
- 4= B1PL
- 5= BT
- 6= BTPL
- 7= Control
- 8= PL

Cuadro 6.13: Análisis de la Varianza para ETR (SC tipo III).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	7	0.058384	0.008341	3.806	0.0016
NEM	1	0.188762	0.188762	86.129	0.0000
TRAT*NEM	7	0.078248	0.011178	5.101	0.0001
Erro	64	0.140263	0.002192		
Total corregido	79	0.465658			

CV(%)= 6.83

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEM	/1	1	0.007576	0.007576	3.457	0.0676
NEM	/2	1	0.027878	0.027878	12.720	0.0007
NEM	/3	1	0.002967	0.002967	1.354	0.2489
NEM	/4	1	0.002016	0.002016	0.920	0.3411
NEM	/5	1	0.045698	0.045698	20.851	0.0000
NEM	/6	1	0.022114	0.022114	10.090	0.0023
NEM	/7	1	0.139181	0.139181	63.506	0.0000
NEM	/8	1	0.019581	0.019581	8.934	0.0040
Erro		64	0.140263	0.002192		

- 1= B1
- 2= B1BT
- 3= B1BTPL
- 4= B1PL
- 5= BT
- 6= BTPL
- 7= Control
- 8= PL

Cuadro 6.14: Análisis de la Varianza para FV (SC tipo III).

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT		7	0.011497	0.001642	0.745	0.6347
NEM		1	0.191615	0.191615	86.941	0.0000
TRAT*NEM		7	0.013422	0.001917	0.870	0.5350
Erro		64	0.141053	0.002204		

Total corregido 79 0.357587

CV (%)= 36.50

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
NEM	/1	1	0.027353	0.027353	12.411	0.0008
NEM	/2	1	0.035135	0.035135	15.942	0.0002
NEM	/3	1	0.027668	0.027668	12.554	0.0007
NEM	/4	1	0.025477	0.025477	11.560	0.0012
NEM	/5	1	0.012268	0.012268	5.566	0.0214
NEM	/6	1	0.005063	0.005063	2.297	0.1345
NEM	/7	1	0.043824	0.043824	19.884	0.0000
NEM	/8	1	0.028249	0.028249	12.818	0.0007
Erro		64	0.141053	0.002204		

- 1= B1
- 2= B1BT
- 3= B1BTPL
- 4= B1PL
- 5= BT
- 6= BTPL
- 7= Control
- 8= PL

Cuadro 6.15: Análisis de la Varianza para Rendimiento (SC tipo III).

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT		7	358.082343	51.154620	0.462	0.8600
NEM		1	1106.669875	1106.669875	9.986	0.0021
TRAT*NEM		7	1560.996927	222.999561	2.012	0.0612
Erro		96	10638.445370	110.817139		

Total corregido 111 13664.194515

CV (%)= 17.70

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
----	--	----	----	----	----	-------

NEM	/1	1	317.777857	317.777857	2.868	0.0936
NEM	/2	1	419.841270	419.841270	3.789	0.0545
NEM	/3	1	637.875000	637.875000	5.756	0.0184
NEM	/4	1	25.785714	25.785714	0.233	0.6306
NEM	/5	1	224.000000	224.000000	2.021	0.1583
NEM	/6	1	672.456404	672.456404	6.068	0.0155
NEM	/7	1	327.055556	327.055556	2.951	0.0890
NEM	/8	1	42.875000	42.875000	0.387	0.5354
Erro		96	10638.445370	110.817139		

- 1= B1
- 2= B1BT
- 3= B1BTPL
- 4= B1PL
- 5= BT
- 6= BTPL
- 7= Control
- 8= PL