



**Evaluación de la interacción extractos botánicos y hongos nematófagos para el control
de *Meloidogyne incognita* en condiciones de laboratorio**

Abarca Antamba, Alisson Estefania y Herrera Zambrano, Ivonne Gardenia

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura


Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología


PhD. Naranjo Gaybor, Sandra Judith

7 de febrero del 2022


Reporte de verificación de contenido




Tesis_Abarca-Herrera.pdf
Scanned on: 22:13 February 6, 2022 UTC



Overall Similarity Score




Results Found



Total Words in Text









Identical Words	153
Words with Minor Changes	20
Paraphrased Words	106
Omitted Words	5705




Tesis_Abarca-Herrera.pdf Scanned on: 22:13 February 6, 2022 UTC

Results

The results contain any sources we have found that include words with identical, minor changes, and paraphrased text in your submitted document.

 UPS-QT09701.pdf https://riopact.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12145/1/UPS-QT09701.pdf	0%	IDENTICAL
 7433194.pdf https://riohnet.unrioja.es/descarga/articulo/7433194.pdf	0%	Identical matches are seen in one exact wording in the text.
 T-ESPE-046538.pdf http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/26241/1/T-ESPE-046538.pdf	0%	MINOR CHANGES
 Recomendaciones de las Naciones Unidas relativas al transporte de... https://unecoc.org/fileadmin/DAM/transport/danger/public/unec/rev2/15T-SG-4C10-1/21...	0%	Nearly identical with different form, in "low" becomes "lowly".
 Rasgos culturales indígenas como elementos estratégicos publicita... https://riopact.ups.edu.ec/bitstream/123456789/21151/1/1019P-07003444.pdf	0%	PARAPHRASED
 Copleaks Internal Database	0%	Close meaning but different words used to convey the same message.
 EJEMPLARES DE TESIS https://www.100share.net/DigihanDC/ejemplares-de-tesis	0%	
 Copleaks Internal Database	0%	

Unsure about your report?
 The results have been found after comparing your submitted text to online sources, open databases and the Copleaks Internal Database. For any questions about the report contact us in support@copyleaks.com
[Learn more about different kinds of plagiarism here](#)

 Website | Education | Businesses

Firma:

PhD. Naranjo Gaybor, Sandra Judith

C.C.: 1709384422

Directora del Proyecto de Investigación



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el artículo académico: **“EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN EXTRACTOS BOTÁNICOS Y HONGOS NEMATÓFAGOS PARA EL CONTROL DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* EN CONDICIONES DE LABORATORIO”** fue realizado por las señoritas **ABARCA ANTAMBA ALISSON ESTEFANIA** y **HERRERA ZAMBRANO IVONNE GARDENIA**, las mismas que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 7 de febrero del 2022

Firma:

PhD. Naranjo Gaybor, Sandra Judith

C.C.: 1709384422

Directora del Proyecto de Investigación



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Nosotras, **ABARCA ANTAMBA ALISSON ESTEFANIA** y **HERRERA ZAMBRANO IVONNE GARDENIA**, con cédulas de ciudadanía N° 2350170599 y N° 2300414014, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN EXTRACTOS BOTÁNICOS Y HONGOS NEMATÓFAGO PARA EL CONTROL DE MELOIDOGYNE INCOGNITA EN CONDICIONES DE LABORATORIO** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 7 de febrero del 2022

Firmas

Abarca Antamba Alisson Estefanía

C.C.:2350170599

Herrera Zambrano Ivonne Gardenia

C.C.:2300414014



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Nosotros **ABARCA ANTAMBA ALISSON ESTEFANIA** y **HERRERA ZAMBRANO IVONNE GARDENIA**, con cédulas de ciudadanía N° 2350170599 y N° 2300414014, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN EXTRACTOS BOTÁNICOS Y HONGOS NEMATÓFAGOS PARA EL CONTROL DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* EN CONDICIONES DE LABORATORIO** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo, 7 de febrero del 2022

Firmas

Abarca Antamba Alisson Estefania

C.C.:2350170599

Herrera Zambrano Ivonne Gardenia

C.C.:2300414014

Dedicatoria

Esta investigación se la dedico a mis amados padres, Mónica y Hernan por su amor, por creer siempre en mí y por darme su apoyo incondicional que me ha permitido cumplir con mis metas, gracias infinitas al dirigirme por el camino del bien con valores y principios.

A mi tía Yessica, por ser mi ejemplo a seguir y acompañarme en los buenos y malos momentos de mi vida, por enseñarme a ser mejor cada día con sus consejos.

A mi abuelita María por cuidar de mí con tanto amor y hacer de mi infancia una etapa llena de buenos recuerdos.

A mi hermano David, que me motiva a seguir adelante y dar un buen ejemplo con mis acciones.

A mi familia en general por su motivación en esta etapa tan importante.

A Andrés por su apoyo a lo largo del desarrollo de esta investigación

Alisson A.

Dedicatoria

Esta investigación se la dedico a mis padres Mariana y Juan, porque muchos de mis logros se los debo a ustedes, me brindaron todo su apoyo para alcanzar mis metas con generosidad, sacrificio, amor y paciencia.

A mi hermana mayor Rebeca, por guiarme hasta conseguir mis sueños.

A mis hermanas menores Jessica, Ana, Evelyn y a mi hermano menor David, por estar siempre a mi lado animándome bajo cualquier circunstancia para seguir adelante.

A mi familia en general por brindarme sus consejos en base a sus experiencias.

A mis amigas Abigail y Arelis, por motivarme con su compañía a pesar de la distancia.

A todas las demás personas quienes siempre han estado acompañándome, formando parte de mi crecimiento como persona.

Ivonne H.

Agradecimiento

Agradecemos a Dios, por permitirnos culminar nuestra formación académica de tercer nivel a lo largo de este tiempo, brindándonos vida, salud, sabiduría y por poner en nuestro camino a personas maravillosas que nos apoyaron en nuestra vida estudiantil.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-INIAP Estación Experimental Santa Catalina por brindarnos todos los recursos para hacer posible nuestra investigación, a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE sede Santo Domingo por los conocimientos brindados.

Especiales agradecimientos a la Ing. Cristina Tello y al Ing. Pablo Llumiquinga por el apoyo incondicional, los conocimientos, la confianza, por estar con nosotras en todas las etapas de la investigación, pero sobre todo, gracias por sembrar en nosotras la pasión por la investigación.

A la Dra. Sandra Naranjo por ser una guía fundamental con sus enseñanzas y consejos brindados como tutora y docente.

Gracias infinitas al Dr. Saul Lema quien estuvo apoyándonos desde el inicio de nuestro trabajo de investigación con sus conocimientos, atención y por todo el tiempo que dedicó para guiarnos en el transcurso de la tesis.

A nuestros amigos incondicionales Nicolly, Josselyn, Carolina, Karen y Brandon, por su apoyo y buenos momentos vividos, gracias, por hacer de nuestra etapa universitaria una de las más importantes en la vida.

Índice de contenido

Carátula.....	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	8
Índice de contenido.....	9
Índice de tablas.....	14
Índice de figuras.....	16
Listado de abreviaturas	17
Resumen.....	19
Abstract.....	20
Capítulo I.....	21
Introducción.....	21
Objetivos de la Investigación	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos	22
Hipótesis	23
Hipótesis nula	23
Hipótesis alternativa	23
Capítulo II.....	24
Marco teórico	24
Nematodos fitoparásitos	24
Generalidades	24

	10
Sintomatología en plantas.....	24
Características de <i>Meloidogyne incognita</i>	26
Ciclo de vida de <i>M. incognita</i>	27
Control biológico.....	28
Extractos botánicos.....	29
Extracto de Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	29
Extracto de Clavo de olor (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	29
Extracto de Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i>)	29
Extracto de Neem (<i>Azadirachta indica</i>)	30
Extracto de Chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>)	30
Hongos nematófagos	31
Género <i>Purpureocillium</i>	32
Género <i>Trichothecium</i>	32
Género <i>Trichoderma</i>	33
Género <i>Beauveria</i>	33
Capítulo III.....	35
Materiales.....	35
Ubicación del Área de Investigación.....	35
Ubicación Política	35
Ubicación Ecológica	35
Ubicación Geográfica	35
Materiales	36
Capítulo IV	39
Fase 1: Identificación molecular de las cepas de hongos nematófagos para el control de <i>M. incognita</i>	39
Metodología.....	39
Multiplicación de hongos nematófagos.....	39

Extracción de ADN	39
Cuantificación	40
Amplificación de la región ITS.....	41
Electroforesis del producto PCR.....	42
Análisis de secuencias	42
Resultados y discusión	43
Cuantificación de ADN	43
Amplificación de las regiones ITS1-ITS4	43
Identificación Molecular	45
Capítulo V	47
Fase 2: Evaluación de la interacción entre extractos botánicos y hongos nematófagos en condiciones <i>in vitro</i>	47
Metodología.....	47
Obtención de extractos botánicos	47
a. Extracto de Clavo de Olor y Canela.....	47
b. Extracto de Chocho.....	47
c. Extracto de Quinoa	47
d. Extracto de Neem.....	48
Análisis de compuestos fitoquímicos de los extractos botánicos	48
a. Alcaloides	48
b. Lupaninas	49
c. Polifenoles	49
d. Flavonoides	50
e. Saponinas.....	50
Prueba de compatibilidad	51
Diseño experimental	51
Tratamientos a comprobar	51

	12
Unidades experimentales	55
Análisis estadístico	55
Análisis de Compatibilidad	55
Variables a evaluar	56
Efectos de inhibición.....	56
Capacidad de esporulación.....	56
Resultados y discusión	57
Análisis de compuestos fitoquímicos de los extractos botánicos.....	57
Efectos de inhibición.....	58
Porcentaje de inhibición	60
Capacidad de esporulación.....	64
Capítulo VI	71
Fase 3: Establecimiento de la interacción extracto botánico y hongo nematófago para el control de <i>M. incognita</i>	71
Metodología.....	71
Filtrados de hongos nematófagos.....	71
Obtención del inóculo de <i>M. incognita</i>	71
Prueba del efecto nematocida en huevos y juveniles (J2) de <i>M. incognita</i>	72
Diseño experimental	72
Tratamientos a comprobar	73
Unidades experimentales.....	74
Tipo de diseño	75
Análisis estadístico	75
Análisis de efecto nematostático.....	75
Variables a evaluar	75
a. Eclosión de huevos de <i>M. incognita</i>	76
b. Mortalidad en juveniles (J2) de <i>M. incognita</i>	76

Resultados y discusión	77
Porcentaje de eclosión de huevos de <i>M. incognita</i>	77
Porcentaje de mortalidad en juveniles (J2) de <i>M. incognita</i>	85
Capítulo VII	95
Conclusiones.....	95
Capítulo VIII	97
Recomendaciones	97
Capítulo IX	98
Bibliografía	98

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica.....	27
Tabla 2 Clasificación de los hongos nematófagos según su método de acción.....	31
Tabla 3 Taxonomía de los hongos nematófagos.....	34
Tabla 4 Materiales, reactivos y equipos requeridos para el estudio.....	36
Tabla 5 Composición del tampón de extracción para volumen final de 100 mL.....	40
Tabla 6 Reactivos y concentraciones utilizadas en la PCR.....	41
Tabla 7 Secuencias de los primers ITS.....	41
Tabla 8 Programa térmico para la validación de ADN.....	42
Tabla 9 Datos obtenidos en la cuantificación de ADN.....	43
Tabla 10 Asignación de identidades moleculares de los hongos.....	45
Tabla 11 Factores y niveles a evaluar en la fase 2.....	51
Tabla 12 Tratamientos para evaluar interacciones de compatibilidad entre extractos botánicos y hongos nematófagos condiciones <i>in vitro</i>	52
Tabla 13 Esquema del análisis de varianza para evaluar la compatibilidad entre extractos botánicos y hongos nematófagos.....	55
Tabla 14 Determinación de alcaloides por colorimetría.....	57
Tabla 15 Determinación de la concentración de polifenoles y flavonoides por espectrofotometría.....	57
Tabla 16 Determinación del porcentaje de Lupaninas y Saponinas	58
Tabla 17 Evaluación de los tratamientos por <i>Kruskal-Wallis</i> al 5%.....	61
Tabla 18 Grupos independientes formados en la variable capacidad de esporulación..	65
Tabla 19 Evaluación de los tratamientos por <i>Kruskal-Wallis</i> al 5%.....	67
Tabla 20 Grupos independientes formados en la variable capacidad de esporulación..	72
Tabla 21 Tratamientos para evaluar las interacciones que tienen un efecto nematicida y/o nematostático.....	73

Tabla 22 Esquema del análisis de varianza para evaluar las interacciones de extracto botánico y hongo nematófago en el control de <i>M. incognita</i>	75
Tabla 23 Análisis de varianza para la variable eclosión de huevos de <i>M. incognita</i> a las 72 h.	77
Tabla 24 Análisis de varianza para la variable eclosión de huevos de <i>M. incognita</i> a las 96 h	78
Tabla 25 Análisis de varianza para la variable eclosión de huevos de <i>M. incognita</i> a las 120 h	78
Tabla 26 Resultado del análisis de <i>Tukey</i> ($p < 0,05$) para los tratamientos en la variable porcentaje de eclosión de los huevo	79
Tabla 27 Análisis de varianza para la variable mortalidad de juveniles (J2) de <i>M. incognita</i> a las 24 h.....	86
Tabla 28 Análisis de varianza para la variable mortalidad de juveniles (J2) de <i>M. incognita</i> a las 48 h.....	86
Tabla 29 Análisis de varianza para la variable mortalidad de juveniles (J2) de <i>M. incognita</i> a las 72 h.....	87
Tabla 30 Resultado del análisis de <i>Tukey</i> ($p < 0,05$) para los tratamientos en la variable porcentaje de eclosión.....	88

Índice de figuras

Figura 1 Raíces de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) infectadas por <i>M. incognita</i>	25
Figura 2 Características morfológicas	26
Figura 3 Ciclo de vida de <i>M. incognita</i>	28
Figura 4 Mapa de ubicación geográfica de la investigación en INIAP-EESC	36
Figura 5 Visualización en el gel de agarosa al 1,5% del producto PCR amplificado.....	44
Figura 6 Crecimiento radial de los hongos nematofagos	58
Figura 7 Porcentaje de inhibición de los hongos nematofagos	60
Figura 8 Determinación de la interacción de grupos independientes para el porcentaje de inhibición	62
Figura 9 Determinación de la distribución de los datos en la capacidad de esporulación	68
Figura 10 Grupos independientes en el porcentaje de eclosión de <i>M. incognita</i> a las 72 h	79
Figura 11 Grupos independientes en el porcentaje de eclosión de <i>M. incognita</i> a las 96 h	81
Figura 12 Grupos independientes en el porcentaje de eclosión de <i>M. incognita</i> a las 120 h	82
Figura 13 Actividad de los hongos nematofagos en huevos de <i>M. incognita</i>	83
Figura 14 Grupos independientes en la mortalidad de juveniles de <i>M. incognita</i> a las 24 h.	89
Figura 15 Grupos independientes en la mortalidad de juveniles de <i>M. incognita</i> a las 48 h	90
Figura 16 Grupos independientes en la mortalidad de juveniles de <i>M. incognita</i> a las 72 h	91

Listado de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADE	Agua destilada esterilizada
Agua UP	Agua ultrapura
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cm	Centímetro
	Agua destilada
dNTPs	Desoxirribonucleótido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramos
GL	Grados de libertad
h	Horas
ITS	Espaciadores internos transcritos
M	Molar
mg	Miligramo
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro sódico
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramo
°C	Grados centígrados
pb	Pares de bases

ppm	Partes por millón
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Agar Patata Dextrosa
RNasa	Ribonucleasa
pH	Potencial Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Sodio dodecil sulfato
s	Segundos
TAE	Tampón tris-acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Taq polimerasa	Thermus aquaticus DNA polimerasa
Tris-HCl	Tris[hidroximetil]aminometano ácido clorhídrico
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
UP	Ultra pura
W	Vatio(s) (Watt(s))

Resumen

El presente trabajo de investigación consiste en tres fases para evaluar el efecto de la interacción extractos botánicos y hongos nematófagos con el fin de controlar al fitoparásito *Meloidogyne incognita* en condiciones de laboratorio. En la primera fase se identificaron molecularmente a las especies de los hongos *Purpureocillium* sp., *Trichothecium* sp., *Trichoderma* sp. y *Beauveria* sp. En la segunda fase se analizaron la compatibilidad de los extractos botánicos de canela, chocho, clavo de olor, quinoa y neem en tres diluciones (1%, 5% y 10%), con el crecimiento micelial y la esporulación de los hongos nematófagos. En la tercera fase se evaluaron las interacciones de extractos botánicos y hongos nematófagos en diferentes estadios de *M. incognita* en juveniles (J2) a las 24, 48 y 72 h, mientras que en huevos a las 72, 96 y 120 h. Los diseños experimentales que se emplearon fueron dos esquemas factoriales completamente al azar con 5 observaciones en cada tratamiento. La especie *Trichoderma virens* fue la menos afectada por la diluciones de los extractos botánicos. Además, fue suficiente 72 horas de exposición con los tratamientos para reducir el porcentaje de eclosión en los huevos y también 24 horas de exposición para incrementar el porcentaje de mortalidad en juveniles (J2) del fitoparásito *M. incognita*, con actividades nematocidas más altas de las interacciones en los hongos identificados como *T. virens*, *B. bassiana* y *P. lilacinum* más las diluciones de los extractos botánicos de quinoa, clavo de olor y neem.

Palabras clave:

- **FITOPARÁSITOS**
- **CONTROL BIOLÓGICO**
- **HONGOS NEMATÓFAGOS**

Abstract

The present research work consists of three phases to evaluate the effect of the interaction between botanical extracts and nematophagous fungi to control the phytoparasite *Meloidogyne incognita* under laboratory conditions. In the first phase, the species of fungi *Purpureocillium sp.*, *Trichothecium sp.*, *Trichoderma sp.* and *Beauveria sp.* were molecularly identified. In the second phase, the compatibility of botanical extracts of cinnamon, chocho, clove, quinoa and neem in three dilutions (1%, 5% and 10%) with the mycelial growth and sporulation of nematophagous fungi was analyzed. In the third phase, the interactions of botanical extracts and nematophagous fungi were evaluated in different stages of *M. incognita* in juveniles (J2) at 24, 48 and 72 h, while in eggs at 72, 96 and 120 h. The experimental designs used were two completely randomized factorial schemes with 5 observations in each treatment. The *Trichoderma virens* species was the least affected by the dilutions of the botanical extracts. In addition, 72 hours of exposure to the treatments was sufficient to reduce the percentage of hatching in the eggs and also 24 hours of exposure to increase the percentage of mortality in juveniles (J2) of the phytoparasite *M. incognita*, with higher nematicidal activities of the interactions in the fungi identified as *T. virens*, *B. bassiana* and *P. lilacinum* plus the dilutions of the botanical extracts of quinoa, clove and neem.

Key words:

- **PHYTOPARASITES**
- **BIOLOGICAL CONTROL**
- **NEMATOPHAGOUS FUNGI**

Capítulo I

Introducción

El género *Meloidogyne* es considerado el grupo de nematodos fitoparásitos más evolucionados, nocivos y de mayor importancia económica en el mundo (Moens et al., 2009), tiene amplia distribución geográfica y rango de hospederos (más de 2000 especies vegetales) (A. Muimba-Kankolongo, 2018), en las que provoca daños como agallas, nudos, lesiones, pudrición en la raíz, clorosis y marchitamiento en el follaje (Yergaliyev et al., 2020), enanismo, y baja productividad (K. P. P. Nair, 2013)

Dentro de este género las especies más importantes son *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Arias et al., 2009), debido a las pérdidas económicas que ocasionan (Robertson et al., 2009). En los últimos años, la especie *Meloidogyne incognita* fue reconocida como un problema potencial en la producción agrícola (Kaspary et al., 2021) y como la más abundante de Ecuador (Guerrero, 2017).

Para el control de esta plaga se suelen aplicar plaguicidas químicos (Mendes et al., 2005). El uso de plaguicidas se ha visto limitado principalmente por sus efectos negativos con el medio ambiente, salud humana, animal y vegetal, por consiguiente, algunos nematicidas cuyos ingredientes activos que resultan ser tóxicos han sido retirados del mercado (El-Saadony et al., 2021). El impacto negativo de éstos ha impulsado la búsqueda de métodos de biocontrol amigables con el agroecosistema (Guerrero, 2017).

En la actualidad, varias investigaciones demuestran la efectividad de los extractos vegetales por sus propiedades biocontroladoras de nematodos fitoparásitos han causado gran interés (Dorman & Deans, 2000). Entre estos, los extractos de clavo

de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum verum*), chocho (*Lupinus mutabilis*) y neem (*Azadirachta indica*) contienen compuestos que tienen actividad nematocida (D'Addabbo & Avato, 2021);(Dubois et al., 2019).

De forma similar existen estudios de la efectividad de algunos hongos en el manejo de nematodos fitoparásitos debido a sus diferentes mecanismos de acción como liberar moléculas bioactivas que favorecen la colonización, parasitismo, entre otros (Poveda et al., 2020). Los hongos más utilizados para el control biológico de fitoparásitos son los géneros: *Purpureocillium*, *Verticillium*, *Hirsutella*, *Nematophthora*, *Arthrobotrys*, *Drechmeria*, *Fusarium* y *Monacrosporium* (Siddiqui & Mahmood, 1996).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar el efecto de la interacción de extractos botánicos y hongos nematófagos para el control de *Meloidogyne incognita* en condiciones de laboratorio.

Objetivos Específicos

Identificar molecularmente las cepas de hongos nematófagos para el control de *M. incognita*

Evaluar la respuesta de la interacción entre extractos botánicos y hongos nematófagos en condiciones *in vitro*.

Establecer las interacciones de los extractos botánicos y hongos nematófagos que tienen efecto nematocida y/o nematostático para *M. incognita* bajo condiciones de laboratorio.

Hipótesis

Hipótesis nula

Ho: Las especies de hongos identificadas molecularmente no pertenecen al grupo de biocontroladores de *M. incognita*.

Ho: Las diluciones de los extractos botánicos no influyen sobre los efectos de inhibición y en la capacidad de esporulación de los hongos nematófagos en condiciones *in vitro*.

Ho: Las interacción de los extractos botánicos y hongos nematofagos no controlan la eclosión de huevos y mortalidad de juveniles de *M. incognita* bajo condiciones de laboratorio.

Hipótesis alternativa

Ha: Las especies de hongos identificadas molecularmente pertenecen al grupo de biocontroladores de *M. incognita*.

Ha: Las diluciones de los extractos botánicos influyen sobre los efectos de inhibición y en la capacidad de esporulación de los hongos nematófagos en condiciones *in vitro*.

Ha: Las interacción de los extractos botánicos y hongos nematofagos controlan la eclosión de huevos y mortalidad de juveniles de *M. incognita* bajo condiciones de laboratorio.

Capítulo II

Marco teórico

Nematodos fitoparásitos

Generalidades

Los nematodos fitoparásitos son animales microscópicos que establecen sitios de alimentación en raíces, tallos, hojas, flores y semillas (Gheysen & Mitchum, 2019), tienen un cuerpo largo, redondo, filiforme y angosto ('*nema*' es hilo en griego), viven en zonas templadas, subtropicales y tropicales (Kiontke & Fitch, 2013) .Existen cerca de 4100 especies pero sólo un grupo restringido son considerados como patógenos (Satyandra Singh et al., 2015).

Según el lugar donde se alimentan, se clasifican en ecto o endoparásitos, algunos son migratorios porque se mueven del suelo hacia los tejidos de la planta, mientras que otros son sedentarios (Pulavarty et al., 2021). Los que causan mayores pérdidas en los cultivos son los nematodos quísticos (*Globodera spp.*, *Heterodera spp.*), agalladores (*Meloidogyne spp.*) y reniforme (*Rotylenchulus spp.*) de naturaleza sedentaria (Jones & Goto, 2011).

Sintomatología en plantas

El nematodo agallador *Meloidogyne incognita* puede infectar a 1.700 especies de plantas (Bellafiore et al., 2008). Las larvas invaden las raíces de los cultivos y se alimentan del sistema vascular, provocan hipertrofia celular (agallas), enanismo, deficiencia de nutrientes, estrés, clorosis y marchitamiento de las hojas (Muimba-Kankolongo, 2018). También, causan pudrición de la raíz y bajan la productividad, incluso interactúan con otros patógenos como *Fusarium*, *Rhizoctonia solani* y

Thielaviopsis basicola (Manzanilla-López & Starr, 2009).

Figura 1

Raíces de tomate (*Solanum lycopersicum*) infectadas por *M. incognita*.



Nota. Obtenido de (Muimba-Kankolongo, 2018).

Las hormonas vegetales principales que actúan en la defensa de las plantas son el jasmonato (JA), el salicilado (SA) y el etileno (ET), lo hacen dependiendo de la interacción específica entre el huésped y el fitoparásito (Molinari & Leonetti, 2019). Sin embargo, los nematodos fitoparásitos han desarrollado una forma de imitar a los efectores de la hormona peptídica vegetal, que sirve para promover el crecimiento de las raíces (Gheysen & Mitchum, 2019).

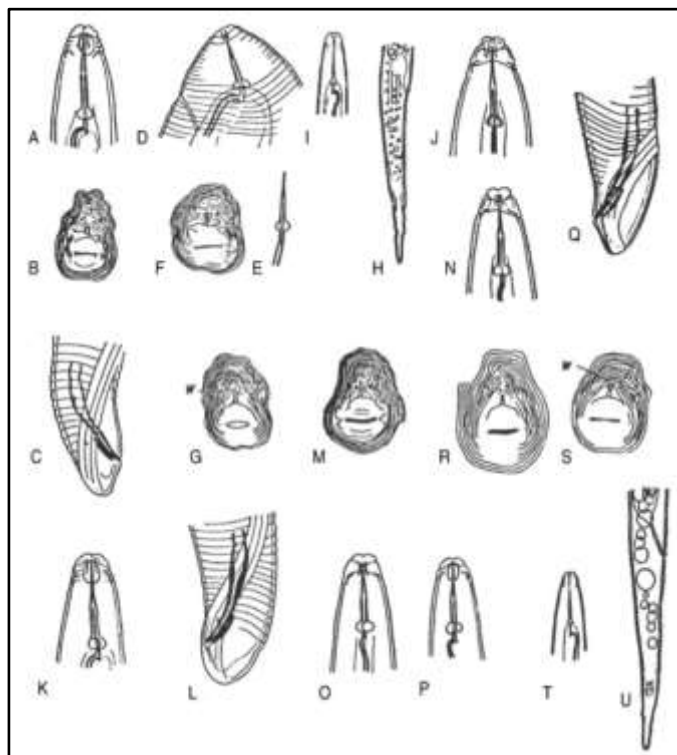
En consecuencia, las plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Hirschmanniella oryzae* que expresan el efector de mutasa de corismato igual que *M. incognita*, son más susceptibles de ser parasitadas (Wang et al., 2018). Además, este fitoparásito tiene la capacidad de imitar al gen NodL de rizobios e inducir la formación de nódulos en las leguminosas (Shi et al., 2018), por otro lado, afectan con mayor prevalencia a plantas de cereales y pastizales (Fleming et al., 2016).

Características de *Meloidogyne incognita*

El nematodo agallador *M. incognita*, puede llegar a medir 690 μm de largo y 16 μm de ancho en hembras, 2000 μm de largo y 23 μm de ancho en los machos (Carneiro & Cofcewicz, 2008). Los juveniles (J2) miden 400 μm de largo y 15 μm de ancho, estos perforan los tejidos de la planta huésped con una estructura en forma de aguja llamada estilete que se encuentra en la cabeza (Shi et al., 2018).

Figura 2

Características morfológicas



Nota. A, J, K, N, O, P: regiones anterior masculino; C, L, Q: extremo posterior masculino; D: región anterior femenina; E: estilete; B, F, G, M, R, S: patrones perineales; H, I, T, U: juveniles (J2) en regiones anterior y posterior. Obtenido de (Carneiro & Cofcewicz, 2008).

En el género *Meloidogyne* existen 98 especies que tienen una amplia gama de huéspedes y son parásitos de plantas vasculares (Moens et al., 2009).

Tabla 1

Clasificación taxonómica.

Reino:	<i>Animalia</i>
División:	<i>Nematoda</i>
Clase:	<i>Secernentea</i>
Orden:	<i>Tylenchida</i>
Familia:	<i>Meloidogynidae</i>
Género:	<i>Meloidogyne spp.</i>
Especie:	<i>Meloidogyne incognita</i>

Nota. Obtenido de (Moens et al., 2009).

Ciclo de vida de *M. incognita*

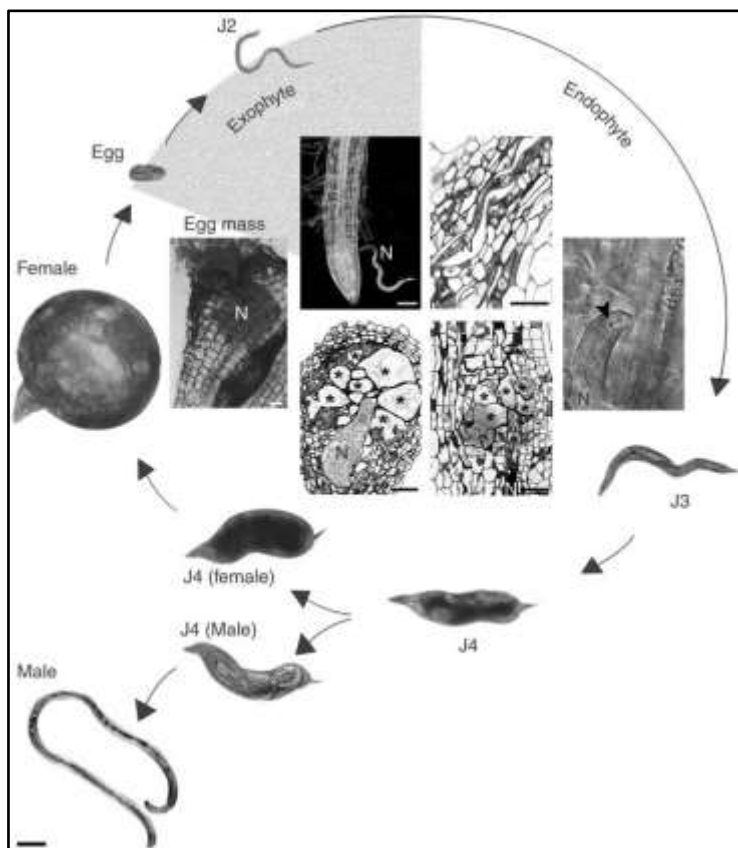
El ciclo de vida tiene una duración de 1 a 2 meses, comprende cinco etapas: los huevos, juveniles (J1), adultos J2, J3 y J4 (Choi et al., 2017). Debido a la amplia variedad de plantas que les sirven como hospederos, son considerados los fitoparásitos que se propagan muy rápidamente (De Waele & Elsen, 2007).

Una sola hembra adulta es capaz de producir entre 500 a 1000 huevos adheridos a las raíces de la planta (Jones & Goto, 2011). Dentro del huevo después de la embriogénesis, nacen los juveniles de la primera etapa (J1) y se mudan para formar los juveniles infecciosos de la segunda etapa (J2) que afectan a los tejidos de las raíces, en la tercera etapa (J3) se vuelven sedentarios y en la cuarta etapa (J4) se

convierten en adultos reproductores (Pulavarty et al., 2021).

Figura 3

Ciclo de vida de M. incognita.



Nota. Obtenido de (Abad et al., 2008).

Control biológico

Los controladores biológicos son agentes orgánicos que sirven para prevenir, mitigar y controlar las enfermedades provocadas por la actividad de un patógeno en un huésped (Jagessar, 2020). Dentro de estos se encuentran los extractos botánicos, los microorganismos fúngicos y bacterianos (Karunamoorthi et al., 2012), que además son interesantes por ser más inocuos y amigables con el medio ambiente (Soumare et al., 2021).

Extractos botánicos

Extracto de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

Cinnamomum zeylanicum, conocida popularmente como canela pertenece a la familia *Lauraceae*, es originaria de Sri Lanka y del sur de la India (Kumar et al., 2015), la canela contiene metabolitos secundarios como cinamaldehído, eugenol, ácido cinamato, ácido cumarico y alcohol cinamílico que presentan propiedades antioxidantes, antifúngicas, antimicrobianas, entre otras (Siripatrawan, 2016).

Extracto de Clavo de olor (*Syzygium aromaticum*)

Syzygium aromaticum conocido popularmente como Clavo de olor pertenece a la familia *Myrtaceae* es nativa de Indonesia (Mbaveng & Kuete, 2017), tiene una amplia gama de compuestos bioactivos como eugenol, β -cariofileno, eugenina y ácido oleanólico, y se ha reportado que posee propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antibacterianas, antisépticas, antihistamínicas, antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas (Gao et al., 2021).

Extracto de Quinoa (*Chenopodium quinoa*)

Chenopodium quinoa es parte de la familia de *Amaranthaceae* (Silva et al., 2020), la quinoa contiene compuestos fitoquímicos como las saponinas, fitoesteroles, flavonoides, fenoles, polisacáridos, proteínas y péptidos bioactivos (Hernández-Ledesma, 2019). Existen más de 30 tipos de saponinas distribuidas en toda la planta, estos compuestos son los que confieren el sabor amargo y se encuentran principalmente en la semilla (Silva et al., 2020)

Las hojas de quinoa son ricas en compuestos fenólicos que presentan propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Silva et al., 2020), por otra parte, las semillas de quinoa tienen alto contenido de saponinas con propiedades biopesticidas (Guzman *et al.*, 2015), actividad citotóxica antimicrobiana y antifúngica (Pereira et al., 2020).

Extracto de Neem (*Azadirachta indica*)

Azadirachta indica es una planta medicinal perteneciente a la familia *Meliaceae* (Fong Lores et al., 2014), originaria de la India, Pakistán, Bangladesh y Nepal, tiene varios compuestos como flavonoides, catequinas, antocianinas, quercetinas, saponinas, taninos, limonoides, ácido gálico (Islas et al., 2020), nimbin, nimbidin y nimbolide (Alzohairy, 2016). Los compuestos del árbol de Neem brindan propiedades antipiréticas, antifúngicas, antihistamínicas, antisépticas, antiinflamatorios, antioxidantes, antibacterianas, antimicrobianas, insecticidas y nematocidas (Islas et al., 2020).

Extracto de Chocho (*Lupinus mutabilis*)

Lupinus mutabilis también nombrado como chocho, es una planta leguminosa de la familia *fabaceae*, usada como fuente proteica en los alimentos y tiene un papel importante en la agricultura para el control de la erosión del del suelo (Gulisano et al., 2019), contiene el mayor porcentaje de alcaloides y se cultiva en altitudes entre 2000 a 3850 m sobre el nivel del mar en las zonas altoandinas (Cortés-Avenidaño et al., 2020).

Las semillas contienen alcaloides de quinolizidina (QA) que representan a un amplio grupo de metabolitos secundarios y se han identificado más de 170 QA en diferentes especies de *Lupinus* (Hama & Strobel, 2020). Son causantes de un sabor amargo, lo que provoca una toxicidad anticolinérgica contra patógenos y depredadores (Gulisano et al., 2019).

Hongos nematófagos

Los hongos nematófagos comprenden más de 700 especies que se clasifican en tres grupos principales: los hongos atrapadores de nemátodos o depredadores, los endoparásitos y los oportunistas u ovicidas (Soares et al., 2018). La capacidad de utilizar a los nematodos fitoparásitos como fuente adicional de nutrientes, la facilidad de crecimiento y adaptabilidad hacen a los hongos nematofagos buenos candidatos para el control biológico (Nordbring-Hertz et al., 2006).

Tabla 2

Clasificación de los hongos nematófagos según su método de acción.

Grupo	Método de acción
Atrapadores de nemátodos o depredadores	Producen hifas que actúan como trampas, con las que, mediante un proceso mecánico / enzimático, se unen para inducir estructuras de captura y digerir larvas de nematodos fitoparásitos.
Oportunista u ovicida	Producen hifas llamadas trampas, con las que, mediante un proceso mecánico / enzimático parasitan y digieren huevos, quistes y hembras de nematodos fitoparásitos.
Endoparásitos	Inmovilizan mediante esporas (conidios, zoosporas) estas que pueden adherirse a la cutícula del nematodo o ser ingeridas.
Productor de toxinas	Secretan toxinas que inmovilizan a los nematodos fitoparásitos, con posterior daño en la parte externa (cutícula) y completa colonización del huésped.
Productores de dispositivos de ataque especiales	Los dispositivos de ataque especiales son similares a una espada afilada y producen daño mecánico a la cutícula del nematodo, lo que resulta en la extravasación del contenido interno del nematodo fitoparásito.

Nota. Obtenido de (Soares et al., 2018).

Género *Purpureocillium*

Purpureocillium es un género de la familia *Ophiocordycipitaceae* con varias especies de importancia como *P. variotti*, *P. marquandii*, *P. javanicus*, *P. fumosoroseus*, *P. viridis* y *P. lilacinum* (Shoff & Perfect, 2021) los cuales se han aislado de una amplia gama de hábitats, incluidos suelos, lodos de aguas residuales e insectos (Senthilkumar et al., 2020).

Como agente biocontrolador algunas especies de *Purpureocillium* pueden producir antibióticos que muestra amplias acciones biológicas (actividades antipalúdicas, antivirales, antibacterianas, antifúngicas, antitumorales y fitotóxicas) ((Ghorbanpour et al., 2018). Además, parasitan a una gran variedad de nematodos fitoparásitos, incluidos los nematodos agalladores, los nematodos excavadores, los nematodos quísticos, los nematodos lesionadores de raíces y los falsos nematodos agalladores (Arthurs & Dara, 2019).

Género *Trichothecium*

El género *Trichothecium* pertenece al orden *Hipocreales*, Algunas de las especies más destacados del género son *T. polybrochum*, *T. cystosporium*, *T. pravicovi*, *T. luteum*, *T. parvum* y *T. roseum*, morfológicamente poseen hifas hialinas, conidióforos y conidios bicelulares o septados con forma ovoide o elipsoidal (Sharma et al., 2014). Investigaciones demuestran que *Trichothecium* produce una serie de metabolitos secundarios, en que incluyen toxinas, antibióticos y otros compuestos biológicamente activos como los tricotecenos (Mostrom, 2015).

Género *Trichoderma*

Las especies de *Trichoderma spp.* se pueden encontrar fácilmente en el medio ambiente, pero especialmente en los suelos ((AGRIOS, 2005). La capacidad de algunas especies de este género para producir enzimas, atacar o inhibir otros hongos ha atraído a varias áreas de investigación, incluido el control biológico de enfermedades de las plantas, estudios de control genético y manipulación en hongos filamentosos (Samuels, 1996).

Trichoderma produce gran cantidad de enzimas extracelulares, muchas de las cuales se aplican en biotecnología, siendo las más conocidas *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma atroviride*, *T. virens*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum* y *Trichoderma longibrachiatum* (Kunamneni et al., 2014), entre las enzimas producidas por las especies mencionadas están las quitinasas y proteasas que tienen potencial para el biocontrol de nematodos fitoparásitos (Kunamneni et al., 2014).

Género *Beauveria*

Beauveria sp. es un hongo filamentoso, perteneciente a la clase Deuteromycetes. Las especies importantes de este género son *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Beauveria amorpha* y *Beauveria caledonica* (Sinha et al., 2016). El género *Beauveria* afecta a un amplio rango de hospederos (más de 700 especies de insectos), por lo tanto, pertenece a los hongos entomopatógenos (Imoulan et al., 2017).

Su mecanismo de infección combina presión mecánica y degradación de los componentes por acción de enzimas: proteasas, esterases, lipasas y quitinasas,

también, pueden penetrar al huésped a través de mecanismo de presión (Hoddle & Van Driesche, 2009), una vez dentro del insecto el hongo aprovecha los nutrientes de la hemolinfa lo que favorece la proliferación y producción de toxinas que eventualmente matan a los insectos (Imoulan et al., 2017).

Tabla 3

Taxonomía de los hongos nematófagos

N°	Reino	Clase	Orden	Familia	Género
1	Fungi	Sordariomycetes	Hypocreales	Ophiocordycipitaceae	<i>Purpureocillium spp.</i>
2	Fungi	Sordariomycetes	Hypocreales	Incertae sedis	<i>Trichothecium spp.</i>
3	Fungi	Hyphomycetes	Moniliales	Moniliaceae	<i>Trichoderma spp.</i>
4	Fungi	Sordariomycetes	Hypocreales	Clavicipitaceae	<i>Beauveria spp.</i>

Nota. Descrito por 1. (Luangsa-Ard et al., 2011), 2. (Rifai & Cooke, 1966), 3. (Martínez et al., 2015)(Martínez et al., 2015), 4. (Imoulan et al., 2017).

Capítulo III

Materiales

Ubicación del Área de Investigación

Ubicación Política

País:	Ecuador
Provincia:	Pichincha
Cantón:	Mejía
Parroquia:	Cutuglagua
Sector:	Panamericana sur, Km 1

Ubicación Ecológica

Zona de vida:	Bosque muy húmedo Montano (bmhM)
Altitud:	3058 msnm
Temperatura:	11.37°C
Precipitación:	1500 mm
Humedad relativa:	83.62%
Heliofanía:	850 horas luz año-1

Ubicación Geográfica

La presente Investigación se realizó en la provincia de Pichincha, parroquia Cutuglagua, en las instalaciones de los Departamentos de Protección Vegetal, Biotecnología y Nutrición y Calidad en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) - Estación Experimental Santa Catalina (EESC). Con el apoyo de los investigadores y tutores Ing. Cristina Tello e Ing. Pablo Llumiquinga.

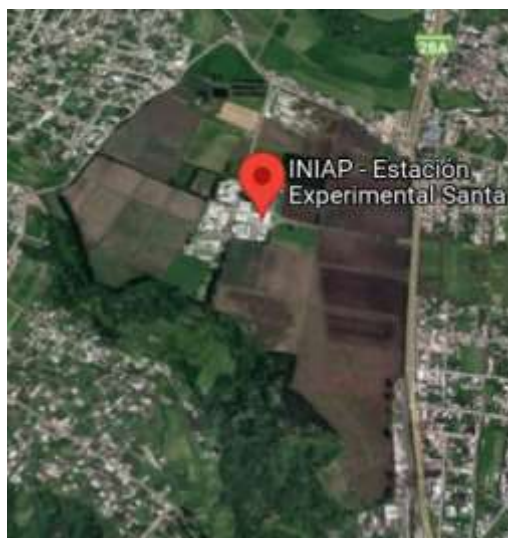
Latitud: 00° 22' S.

Longitud: 78° 33' W.

Altitud: 3058 m.

Figura 4

Mapa de ubicación geográfica de la investigación en INIAP-EESC.



Nota. Obtenido de Google Maps.

Materiales

Los materiales necesarios para la ejecución del proyecto de investigación se describen en la tabla 4.

Tabla 4

Materiales, reactivos y equipos requeridos para el estudio.

Muestras	Insumos	Equipo	Reactivos
Aislamientos de <i>Trichothecium</i> sp.,	Asa de siembra	Autoclave tuttner	Ácido acético
<i>Beauveria</i> sp.,	Bisturí	Baño maría	Ácido gálico
<i>Trichoderma</i> sp. y	Bandeja de incubación	Balanza analítica shimadzu	Ácido láctico
<i>Purpureocillium</i> sp.	Embudo	Cámara de flujo	Ácido sulfúrico
			ADE

Muestras	Insumos	Equipo	Reactivos
Plantas de tomate	Frascos	laminar Biobase	Alcohol potable
riñón	de vidrio	Cámara de	Carbonato de sodio
Corteza de Canela	Filtro millipore	Neubauer Marienfeld	Cloruro de aluminio
Hojas de Neem	Gasas estériles	Computador LG	EDTA
Flores de Clavo de	Matraz de	Centrífuga SIGMA	Etanol
olor	Erlenmeyer	Concentrador de	Estreptomina
Semillas de Chocho	Matraz de aforo	ADN	Fenol-Cloroformo
Semillas de Quinoa	Mechero de	Labconco	Folin & Ciocalteu's
Semillas de Neem	alcohol	Estereomicroscopio	Hipoclorito de sodio
	Microplacas	Equipo de	Hidróxido de sodio
	Minibola	Electroforesis	Medio PDA
	mezcladora	MS major science	Metanol
	Mortero	Espectrofotómetro	NaCl
	Micropipetas	Shimadzu y de	Nitrito de Sodio
	boeco	microplacas Epoch	RNasa
	Papel Whatman	Extractor de	Reactivo de Mayer
	N° 1	compuestos activos	SDS
	Papel filtro	Armfield y Licuadora	Tris-HCL
	Papel aluminio	Homogenizador	
	Pipeta Pasteur	FastPrep-24	
	Pipetas 1 a 100 ul	Incubadora incucell	
	Placas de Petri	Microscopio óptico	
	Placas de	olympus	
	cultivo celular	Microscopio invertido	
	Placas de	ZEISS	
	cultivo celular	Microestufa Blue	
	Placa de vidrio	Molino mezclador	
	con cavidades	MM 200	
	Recipientes de	Plancha de	
	plástico	calentamiento y	
	Tamiz de 25 um	agitación cole	
	Tamiz de 74 um	parmer	

Muestras	Insumos	Equipo	Reactivos
	Tubos de ensayo	Rotavapor JP	
	Tubos Falcon	selecta	
	Tubos	Refrigeradora	
	Eppendorf	Termobloque	
	Vasos de	BATH ALB64	
	precipitación	Termociclador	
		SimpliAmp	
		Ultrasonido	
		Vortex MIXER	

Capítulo IV

Fase 1: Identificación molecular de las cepas de hongos nematófagos para el control de *M. incognita*

El interés sobre los hongos nematofagos ha ido incrementando debido a los avances y aplicaciones en el control biológico. Los análisis moleculares han permitido entender de mejor manera la función de estos hongos en base a su taxonomía, por ello, se realizó la identificación de molecular de los aislados de hongos, proporcionados por el departamento de fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-INIAP-Estación Experimental Santa Catalina.

Metodología

Multiplicación de hongos nematófagos

En un frasco de vidrio se agregó 39 g de PDA comercial y 1 L de dH₂O, se autoclavó por 15 min a 121°C. Luego, se agregaron 40 gotas de ácido láctico al medio autoclavado y se dispensó en placas de Petri dentro de la cámara de flujo laminar. Después, con una pipeta Pasteur se realizaron discos de 5 mm² en el micelio de los cinco aislamientos de hongos nematófagos que fueron: H1 (*Purpureocillium* sp.), H2 (*Purpureocillium* sp.), H3 (*Trichothecium* sp.), H4 (*Trichoderma* sp.) y H5 (*Beauveria* sp.). Posteriormente, se colocó un disco del micelio en el centro de las placas de *Petri* con el medio PDA y se incubaron por 10 días a 23 °C.

Extracción de ADN

El procedimiento de extracción de los cinco aislamientos de hongos nematófagos, se realizó según la metodología descrita por Plaza et al. (2004). Por lo cual, se agregó 500 mg de micelio en tubos Eppendorf más 6 minibolas mezcladoras y

500 µl del buffer de extracción (tabla 5). Luego, se colocaron en el molino mezclador por 10 min y se centrifugó a 13000 rpm por 11 min, el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos sobre hielo y se añadió fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).

Después, se mezcló con vortex y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, el sobrenadante se colocó en nuevos tubos. Luego, se agregó cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó con vórtex y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. Se recogió el sobrenadante y se añadieron 1200 uL de isopropanol frío a -20 °C por 1 h. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm por 10 min., se descartó el sobrenadante y se lavaron los pellets de ADN con 1 mL de etanol al 70% dos veces, se colocó en el concentrador de ADN por 30 min a 37 °C y se añadió 100 µl de TE. Finalmente, se añadió 2 µl de RNasa a los tubos Eppendorf y se incubó en el termobloque por 30 minutos.

Tabla 5

Composición del tampón de extracción para volumen final de 100 mL

Soluciones Stock/reactivos	Cantidad	Concentración final
Tris HCl pH 8 (1M)	20 mL	200mM
NaCl (5M)	5 mL	250mM
EDTA pH 8 (0.5M)	5 mL	25mM
SDS	5 g	0.5%
ADE	Aforado hasta 100 mL	

Nota. Obtenido de (Płaza et al., 2004).

Cuantificación

La concentración en ng/uL de las cinco muestras de ADN extraído, se cuantificó con el espectrofotómetro de microplacas Epoch y en el programa Gen 5. Se tomó una

alícuota de 2 uL de la muestra en blanco (agua UP). Luego, se tomó 2 uL de cada una de las muestras de ADN extraídas.

Amplificación de la región ITS

Las cinco muestras de ADN de los hongos, fueron diluidas a 20 ng/uL con ADE para ser validadas con los *primers* ITS1/ITS4. Luego, se realizó una PCR convencional de las muestras (tabla 6 y 7), con el control negativo (ADE) y positivo (ADN de *Fusarium sp.*) y se amplificó con el programa descrito en la tabla 8.

Tabla 6

Reactivos y concentraciones utilizadas en la PCR

Compuestos de la PCR	Concentración Final	Volumen final 1rx
Agua UP	-	15,00 uL
Buffer PCR	0,5 x	2,50 uL
MgCl ₂	1,5 mM	1,50 uL
dNTPs	0,1 mM	0,50 uL
<i>Primer ITS1</i>	0,4 uM	2,00 uL
<i>Primer ITS4</i>	0,4 uM	2,00 uL
<i>Taq Polimerasa</i>	0,1 U/uL	0,50 uL
ADN (ng/uL)	1 uL	1 uL

Nota. Total de la reacción es de 25 uL, obtenido de (Morillo & Miño, 2011).

Tabla 7

Secuencias de los primers ITS.

Primer	Secuencia
<i>ITS1</i>	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
<i>ITS4</i>	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

Nota. Obtenido de (White et al., 1990).

Tabla 8

Programa térmico para la validación de ADN.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	1 min	
Hibridación	55°C	2 min	35
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	70°C	10 min	1
Mantenimiento	4°C	5 min	1

Nota. Obtenido de (Morillo & Miño, 2011).

Electroforesis del producto PCR

Se realizó la electroforesis según la metodología descrita por Morillo & Miño (2011). Primero, se preparó un gel de agarosa al 1,5 % y se colocó en inmersión con TAE 1x en la cubeta de electroforesis. Luego, se agregó 5 ul del marcador de peso molecular TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder en el primer pocillo y 5 ul de los productos PCR en los siguientes pocillos. Después, se corrió la cámara de electroforesis a 100 W por 40 minutos y se visualizó el gel en el fotodocumentador.

Análisis de secuencias

Los productos PCR amplificados, se enviaron a secuenciar en MacroGen CES (Secuenciación de Sanger) como un servicio externo. Luego, los resultados de las secuencias se analizaron en los programas bioinformáticos de Chromas 2.6.6, MEGA 11, BioEdit 7.2 y en la base de datos BLAST del sitio web NCB (Madden et al., 1996).

Resultados y discusión

Cuantificación de ADN

Los niveles de absorbancia demostraron la calidad de la extracción de las muestras de ADN que se obtuvieron en los cinco aislamientos (Tabla 9). En el género *Trichoderma sp.* se obtuvo un valor de 1,7 lo que determina una pureza aceptable, mientras que los demás géneros se encontraron en un rango de 1.8-2.1, que corresponde a una pureza óptima (Bancoadn, 2020).

Tabla 9

Datos obtenidos en la cuantificación de ADN.

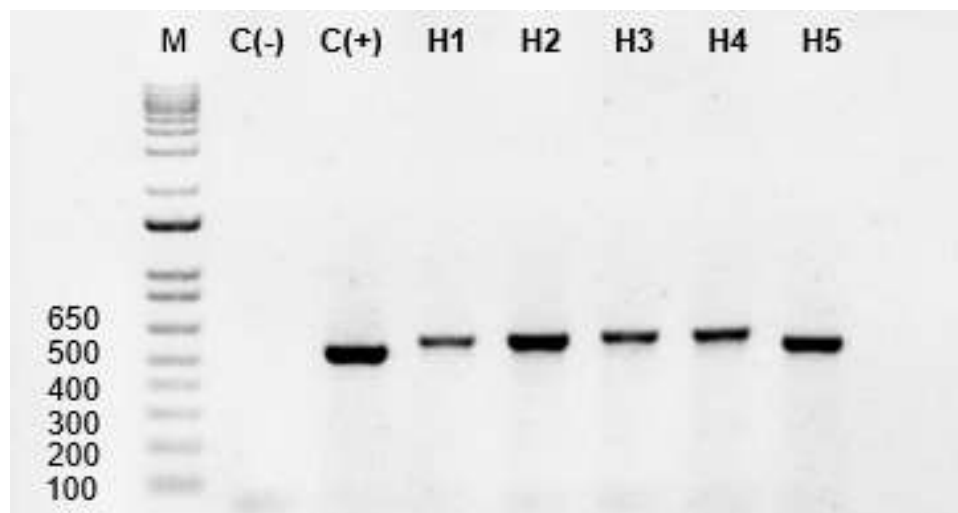
Muestra	Género	Absorbancia (260/280)	Concentración (ng/μL)
H1	<i>Purpureocillium sp.</i>	1,946	78,832
H2	<i>Purpureocillium sp.</i>	1,857	44,454
H3	<i>Trichothecium sp.</i>	2,037	61,455
H4	<i>Trichoderma sp.</i>	1,747	67,331
H5	<i>Beauveria sp.</i>	1,948	348,707

Amplificación de las regiones ITS1-ITS4

Los amplicones (figura 5), demostraron la efectividad de la PCR con el ADN de los hongos nematófagos y los *primers* universales ITS1 (*forward*) e ITS4 (*reverse*), ya que se presentaron bandas bien definidas con un tamaño de fragmento molecular de 500 a 650 pb para el control positivo y los cinco aislamientos.

Figura 5

Visualización en el gel de agarosa al 1,5% del producto PCR amplificado.



Nota. M: Marcador de peso molecular; C(-): Control negativo; C(+): Control positivo (ADN de *Fusarium sp.*); H1: Primer aislamiento de *Purpureocillium sp.*; H2: Segundo aislamiento de *Purpureocillium sp.*; H3: *Trichothecium sp.*; H4: *Trichoderma sp.*; H5: *Beauveria sp.*

Los aislamientos fúngicos que se identificaron genéticamente con las regiones ITS del ADN ribosomal evidenciaron en la amplificación por PCR, un tamaño de fragmento aproximado de 500 a 600 pb. Por lo cual, el resultado del control negativo demostró que no existió contaminación en las muestras y el control positivo presentó similitud con el estudio realizado por Zarrin et al. (2016), en el que reportaron bandas con un tamaño molecular de 550 pb para 50 cepas aisladas del género *Fusarium spp.*

Los aislamientos identificados como *Purpureocillium lilacinum* (H1 y H2), concuerdan con la investigación realizada por Sun et al. (2020), en la que obtuvieron un tamaño molecular que oscila entre 535 a 543 pb en distintos aislados de esta especie, mientras que el aislamiento *Trichothecium roseum* (H3), coincidió con la investigación

de Raya-pérez et al. (2018), en el que determinaron un tamaño molecular de 600 pb en distintos aislados del hongo.

El aislamiento de *Trichoderma virens* (H4) presentó similitud con en el estudio realizado por Masaquiza Chango (2019), en el que obtuvo un tamaño molecular de 600 pb para un aislado de la especie mencionada. Finalmente, el aislamiento *Beauveria bassiana* (H5) demostró concordancia con la investigación realizada por Gebremariam et al. (2021) en el cual identificaron 4 aislados con un tamaño molecular de 545 pb

Identificación Molecular

El análisis de las secuencias para los cinco aislamientos, a partir de las regiones ITS con el programa bioinformático BLAST se muestran en la tabla 10. En el cual, los hongos con un porcentaje de identidad menor al 97% son poco confiables ya que no se asegura que la especie sea la indicada, es posible que sea una nueva especie que no está aún descrita en la base de datos (Ozkan & Ahmet, 2016).

Tabla 10

Asignación de identidades moleculares de los hongos.

Aislamientos	Especies identificadas	Identidad (%)	Accesión
H1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	97,61 %	MF996811.1
H2	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	97.88%	KY495192.1
H3	<i>T. roseum</i>	99.72%	MT093263.1
H4	<i>T. virens</i>	99.74%	LC500602.1
H5	<i>Beauveria bassiana</i>	97.95%	OK331343.1

Purpureocillium lilacinum ha sido ampliamente utilizada como un agente de control biológico para nematodos fitoparásitos (Prasad et al., 2015), con gran potencial para disminuir la infección causada por *M. incognita* en los cultivos (Chen & Hu, 2022). Según, Kiewnick et al. (2006) una de las cepas denominada PL251, fue registrada como un nematocida biológico en Estados Unidos.

Según Zhang et al. (2010), la cepa LZ93 de *Maytenus hookeri* que pertenece a la *Trichothecium roseum*, se ha reportado que antagoniza a otros hongos fitopatógenos in vitro. Además, algunas investigaciones han descrito a *Trichoderma virens*, actúa como biocontrolador de fitopatógenos y fitoparásitos en la agricultura (Du et al., 2020) y que tiene actividad antagonista en plantas infectadas con *M. incognita* (Espinoza et al., 2015).

B. bassiana es una especie de hongo entomopatógeno, capaz de vivir como saprófito y endófito (Tartanus et al., 2021), con gran importancia para el control biológico porque actúa como enemigo natural contra insectos y fitoparásitos (W. Zhang et al., 2016). Según Youssef et al. (2020), puede tener más de un solo metabolito bioactivo con actividad nematocida, lo que provoca compuestos nematotóxicos en los fitoparásitos.

Capítulo V

Fase 2: Evaluación de la interacción entre extractos botánicos y hongos nematófagos en condiciones *in vitro*.

Se analizó el efecto de los extractos botánicos de canela, chocho, clavo de olor, quinoa y neem con diferentes diluciones (1%, 5% y 10%), en el crecimiento micelial y esporulación de los hongos nematofagos, el porcentaje de inhibición se evaluó a los 7 días, mientras que la esporulación a los 14, adicionalmente se realizó un análisis fitoquímico de los extractos botánicos.

Metodología

Obtención de extractos botánicos

a. Extracto de Clavo de Olor y Canela

En el equipo extractor de compuestos activos Armfield, se colocó 765 g de flores de clavo de olor molidas con Etanol: dH₂O (1:1) y 687 g de corteza de la canela molidas con Metanol: dH₂O (1:1) durante 5 ciclos a 30°C por 2 h. Después se colocaron en el rotavapor a 80°C y los extractos se almacenaron a 4°C (INIAP, 2021).

b. Extracto de Chocho

En el equipo extractor de compuestos activos Armfield, se colocó 1070 g de la semilla de chocho molido con 6 L de dH₂O, durante 5 ciclos a 30°C por 2 h y el extracto se guardó a -20°C (INIAP, 2021).

c. Extracto de Quinoa

En un frasco de vidrio se añadieron 500 mg de semillas molidas de quinoa con 1250 mL de dH₂O, se agitó por 4 h, se dejó reposar por 8 h y se filtró. Luego, se agregaron 500 mL de dH₂O al extracto filtrado, se centrifugó a 4000 rpm por 20 min y el sobrenadante se almacenó a -20°C (Prado, 2018).

d. Extracto de Neem

Las semillas de Neem descortezadas se colocaron a la estufa a 60 °C por 48 h, se licuaron y se colocaron en fundas de papel filtros sellados. Luego, se sumergieron en una solución de hexano por 24 h y se dejó secar por 48 h a temperatura ambiente. Se sumergieron en una solución de Acetona: Etanol: Metanol (1:1:1) por 24 h y la mezcla se colocó en el rotavapor a 80°C (López-Pantoja et al., 2007). También, se realizó otra extracción en un frasco de vidrio donde se colocó 10 g de hojas secas de Neem molidas con 1000 mL de agua, se agitó la mezcla por 24 h y se filtró (Cruz Fernandez & Sánchez, 2004). Los extractos obtenidos se almacenaron a 4°C.

Análisis de compuestos fitoquímicos de los extractos botánicos

Procedimientos realizados según los protocolos del Laboratorio de Nutrición y Calidad (INIAP, 2021).

a. Alcaloides

En una placa de vidrio con cavidades, se colocaron 1000 ul del extracto botánico (canela, clavo de olor, quinua, chocho o neem) y 1000 ul del reactivo de *Mayer*. Luego, se esperó 5 minutos y la formación de un precipitado blanco amarillento indicó que la muestra era positiva para alcaloides.

b. Lupaninas

En un vaso de precipitación, se colocaron 10 mL del extracto de chocho, se añadió 3 gotas de fenolftaleína, luego se tituló con NaOH a 0,1 N, se reemplazaron los datos del volumen en la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje (P/V)} = \frac{V(\text{mL}) * 0.1(\text{Eq/g}) * Pm(\text{g}) * 1L}{1L * Vm * 1000\text{ml}}$$

Donde:

V= Volumen utilizado de NaOH a 0,1 N

Pm: Peso de la muestra

Vm= Volumen muestra

$$\text{Alcaloides totales expresados en lupaninas} = \frac{V(\text{mL}) * 0.1(\text{Eq/g}) * Pm(\text{g}) * 1L}{1L * Pi(\text{g}) * 1000\text{ml}} * 100$$

Donde:

V= Volumen utilizado de NaOH a 0,1 N

Pm: Peso de la muestra

Pi= Peso de la muestra inicial

c. Polifenoles

En un tubo de ensayo, se colocó 1 mL del extracto botánico (clavo de olor o canela) diluido con dH₂O y 6 mL de dH₂O. Luego, se agregó 1 mL de Folin & Ciocalteu's, se agitó y se dejó reposar por 3 min. Después, se agregó 2 mL de la solución de Carbonato de sodio al 20% y se agitó. Posteriormente, se colocó el tubo de ensayo en baño María por 2 min y se midió la absorbancia de la solución a 760 nm. Se obtuvieron los datos con la curva estandarizada de ácido gálico y se reemplazaron en la siguiente fórmula:

$$mg.\acute{a}cido\ g\acute{a}lico/g.muestra\ (mg\ AGE/g) = \frac{LR(mg/L) * Vt\ (L) * FD}{Pm\ (g)}$$

Donde:

LR= Lectura de regresión

Vt= Volumen total

Pm= Peso de la muestra

FD= Factor de dilución

d. Flavonoides

En un tubo de ensayo, se colocó 1 mL del extracto de neem diluido con dH₂O y 4 mL de dH₂O. Luego, se agregó 300 uL de la solución de nitrito de sodio al 5%, se agitó y se dejó reposar por 5 min. Después, se agregó 300 uL de la solución de cloruro de aluminio al 10%, se agitó y se dejó reposar por 5 min. Posteriormente, se colocó 2 mL de hidróxido de sodio 1 N y 2,4 mL de dH₂O, se realizó un vortex por 2 min. Finalmente, se midió la absorbancia de la solución a 490 nm y se expresaron los datos como mg catequina/g (mg CAE/g), por la interpolación de la absorbancia obtenida en la curva de calibración de Flavonoides.

e. Saponinas

En un matraz de aforo, se colocó 1 mL del extracto de quinua y se aforo con dH₂O a 25 mL. Luego, en cinco tubos de ensayo se colocaron 250 uL del extracto diluido y se agregó 1 mL de la solución ácido acético: ácido sulfúrico (1:1). Se agitaron y se pusieron a baño María a 60 °C por 30 minutos. Después, se midió la absorbancia a 528 nm y se obtuvieron los datos según la curva estándar de Saponinas.

Prueba de compatibilidad

En la cámara de flujo laminar, se filtraron los extractos botánicos con papel Whatman N° 1 y en matraces Erlenmeyer se colocaron las diluciones de los extractos al 10%, 5% y 1% con el medio de cultivo PDA autoclavado, se mezcló y se dispensó en placas de Petri. Luego, se realizó según el método de Racines et al., (2019), con la pipeta Pasteur se hicieron discos de 5 mm² en el micelio de cada hongo nematófago y se colocaron en el centro de las placas de Petri dispensadas con el medio PDA más el extracto. Después, se realizaron controles sin extracto y se incubaron a 21 °C por 14 días.

Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental completamente al azar (AxBxC+1) con 5 niveles en los factores A y B, 3 niveles en el factor C que se muestra en la tabla 11 y un testigo.

Tabla 11

Factores y niveles a evaluar en la fase 2

Hongos nematófagos (A)	Extractos botánicos (B)	Diluciones (C)
a1. <i>Purpureocillium lilacinum</i>	b1. Extracto de canela	c1. Dilución al 10%
a2. <i>Purpureocillium lilacinum</i>	b2. Extracto de clavo de olor	c2. Dilución al 5%
a3. <i>T. roseum</i>	b3. Extracto de Quinoa	c3. Dilución al 1%
a4. <i>T. virens</i>	b4. Extracto de neem	
a5. <i>Beauveria bassiana</i>	b5. Extracto de Chocho	

Tratamientos a comprobar

Se realizaron 5 observaciones para cada uno de los tratamientos (tabla 12).

Tabla 12

Tratamientos para evaluar interacciones de compatibilidad entre extractos botánicos y hongos nematófagos condiciones in vitro

Nº	Tratamientos	Descripción
T1	a1b1c1	<i>P. lilacinum</i> + Canela + Dilución 10%
T2	a1b1c2	<i>P. lilacinum</i> + Canela + Dilución 5%
T3	a1b1c3	<i>P. lilacinum</i> + Canela + Dilución 1%
T4	a1b2c1	<i>P. lilacinum</i> + Clavo de Olor + Dilución 10%
T5	a1b2c2	<i>P. lilacinum</i> + Clavo de Olor + Dilución 5%
T6	a1b2c3	<i>P. lilacinum</i> + Clavo de Olor + Dilución 1%
T7	a1b3c1	<i>P. lilacinum</i> + Quinoa + Dilución 10%
T8	a1b3c2	<i>P. lilacinum</i> + Quinoa + Dilución 5%
T9	a1b3c3	<i>P. lilacinum</i> + Quinoa + Dilución 1%
T10	a1b4c1	<i>P. lilacinum</i> + Neem + Dilución 10%
T11	a1b4c2	<i>P. lilacinum</i> + Neem + Dilución 5%
T12	a1b4c3	<i>P. lilacinum</i> + Neem + Dilución 1%
T13	a1b5c1	<i>P. lilacinum</i> + Chocho + Dilución 10%
T14	a1b5c2	<i>P. lilacinum</i> + Chocho + Dilución 5%
T15	a1b5c3	<i>P. lilacinum</i> + Chocho + Dilución 1%
T16	a1c0	<i>P. lilacinum</i> + Co Control
T17	a2b1c1	<i>P. lilacinum</i> + Canela + Dilución 10%
T18	a2b1c2	<i>P. lilacinum</i> + Canela + Dilución 5%
T19	a2b1c3	<i>P. lilacinum</i> + Canela + Dilución 1%
T20	a2b2c1	<i>P. lilacinum</i> + Clavo de Olor + Dilución 10%
T21	a2b2c2	<i>P. lilacinum</i> + Clavo de Olor + Dilución 5%
T22	a2b2c3	<i>P. lilacinum</i> + Clavo de Olor + Dilución 1%
T23	a2b3c1	<i>P. lilacinum</i> + Quinoa + Dilución 10%
T24	a2b3c2	<i>P. lilacinum</i> + Quinoa + Dilución 5%

Nº	Tratamientos	Descripción
T25	a2b3c3	<i>P. lilacinum</i> + Quinoa + Dilución 1%
T26	a2b4c1	<i>P. lilacinum</i> + Neem + Dilución 10%
T27	a2b4c2	<i>P. lilacinum</i> + Neem + Dilución 5%
T28	a2b4c3	<i>P. lilacinum</i> + Neem + Dilución 1%
T29	a2b5c1	<i>P. lilacinum</i> + Chocho + Dilución 10%
T30	a2b5c2	<i>P. lilacinum</i> + Chocho + Dilución 5%
T31	a2b5c3	<i>P. lilacinum</i> + Chocho + Dilución 1%
T32	a2c0	<i>P. lilacinum</i> + Co Control
T33	a3b1c1	<i>T. roseum</i> + Canela + Dilución 10%
T34	a3b1c2	<i>T. roseum</i> + Canela + Dilución 5%
T35	a3b1c3	<i>T. roseum</i> + Canela + Dilución 1%
T36	a3b2c1	<i>T. roseum</i> + Clavo de Olor + Dilución 10%
T37	a3b2c2	<i>T. roseum</i> + Clavo de Olor + Dilución 5%
T38	a3b2c3	<i>T. roseum</i> + Clavo de Olor + Dilución 1%
T39	a3b3c1	<i>T. roseum</i> + Quinoa + Dilución 10%
T40	a3b3c2	<i>T. roseum</i> + Quinoa + Dilución 5%
T41	a3b3c3	<i>T. roseum</i> + Quinoa + Dilución 1%
T42	a3b4c1	<i>T. roseum</i> + Neem + Dilución 10%
T43	a3b4c2	<i>T. roseum</i> + Neem + Dilución 5%
T44	a3b4c3	<i>T. roseum</i> + Neem+ Dilución 1%
T45	a3b5c1	<i>T. roseum</i> + Chocho + Dilución 10%
T46	a3b5c2	<i>T. roseum</i> + Chocho + Dilución 5%
T47	a3b5c3	<i>T. roseum</i> + Chocho + Dilución 1%
T49	a3co	<i>T. roseum</i> + Control
T50	a4b1c1	<i>T. virens</i> + Canela + Dilución 10%
T51	a4b1c2	<i>T. virens</i> + Canela + Dilución 5%
T52	a4b1c3	<i>T. virens</i> + Canela + Dilución 1%

Nº	Tratamientos	Descripción
T53	a4b2c1	<i>T. virens</i> + Clavo de Olor + Dilución 10%
T54	a4b2c2	<i>T. virens</i> + Clavo de Olor + Dilución 5%
T55	a4b2c3	<i>T. virens</i> + Clavo de Olor + Dilución 1%
T56	a4b3c1	<i>T. virens</i> + Quinoa + Dilución 10%
T57	a4b3c2	<i>T. virens</i> + Quinoa + Dilución 5%
T58	a4b3c3	<i>T. virens</i> + Quinoa + Dilución 1%
T59	a4b4c1	<i>T. virens</i> + Neem + Dilución 10%
T60	a4b4c2	<i>T. virens</i> + Neem + Dilución 5%
T61	a4b4c3	<i>T. virens</i> + Neem+ Dilución 1%
T62	a4b5c1	<i>T. virens</i> + Chocho + Dilución 10%
T63	a4b5c2	<i>T. virens</i> + Chocho + Dilución 5%
T64	a4b5c3	<i>T. virens</i> + Chocho + Dilución 1%
T65	a4co	<i>T. virens</i> + Co Control
T66	a5b1c1	<i>B. bassiana</i> + Canela + Dilución 10%
T67	a5b1c2	<i>B. bassiana</i> + Canela + Dilución 5%
T68	a5b1c3	<i>B. bassiana</i> + Canela + Dilución 1%
T69	a5b2c1	<i>B. bassiana</i> + Clavo de Olor + Dilución 10%
T70	a5b2c2	<i>B. bassiana</i> + Clavo de Olor + Dilución 5%
T71	a5b2c3	<i>B. bassiana</i> + Clavo de Olor + Dilución 1%
T72	a5b3c1	<i>B. bassiana</i> + Quinoa + Dilución 10%
T73	a5b3c2	<i>B. bassiana</i> + Quinoa + Dilución 5%
T74	a5b3c3	<i>B. bassiana</i> + Quinoa + Dilución 1%
T75	a5b4c1	<i>B. bassiana</i> + Neem + Dilución 10%
T76	a5b4c2	<i>B. bassiana</i> + Neem + Dilución 5%
T77	a5b4c3	<i>B. bassiana</i> + Neem+ Dilución 1%
T78	a5b5c1	<i>B. bassiana</i> + Chocho + Dilución 10%
T79	a5b5c2	<i>B. bassiana</i> + Chocho + Dilución 5%

Nº	Tratamientos	Descripción
T80	a5b5c3	<i>B. bassiana</i> + Chocho + Dilución 1%
T81	a5co	<i>B. bassiana</i> + Control

Unidades experimentales

La unidad experimental consistió en una placa de Petri de 9 cm con medio de cultivo PDA, en las cuales se evaluó la interacción entre los factores.

Tipo de diseño

Se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 5x5x3+1 con 81 tratamientos y 5 observaciones.

Análisis estadístico

Se analizaron los supuestos de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov al 5%. Las variables que cumplieron estos supuestos, fueron tratados con un análisis de varianza (ANOVA) al 5%, caso contrario se trataron con una prueba de Kruskal-Wallis al 5%. El análisis se realizó con el software estadístico R 3.3.1.

Análisis de Compatibilidad

Tabla 13

Esquema del análisis de varianza para evaluar la compatibilidad entre extractos botánicos y hongos nematófagos.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Tratamientos	80
Observaciones	4
Hongos nematófagos	4
Extractos botánicos	4

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Diluciones de extractos	2
Hongo x Extracto x Diluciones	32
Testigo (Control)	1
Error (b)	247
TOTAL	374

Variables a evaluar

Efectos de inhibición

El crecimiento radial del micelio en las placas de *Petri* con los tratamientos, se midió a los 7 días. Después, se calculó el porcentaje de inhibición comparado con los controles, con la fórmula descrita por Vincent, (1947):

$$I = ((C - T) * 100 / C)$$

Donde:

I= Porcentaje de inhibición.

C= Crecimiento radial del micelio en tratamiento control (cm).

T= Crecimiento radial del micelio del tratamiento (cm).

Capacidad de esporulación

A los 14 días, en tubos Eppendorf se colocó 1 mL de ADE y un disco de 5 mm² del micelio según cada tratamiento. Luego, se realizó vortex por 3 min y se contabilizó el número de conidias con la cámara de Neubauer. Después, se calculó la capacidad de esporulación con la fórmula ajustada de Gómez et al. (2014):

$$\text{Concentración de conidios} = X * 10000 * 16 * FD$$

Donde:

X= Promedio de las 20 lecturas por área de conteo.

FD= Factor de dilución.

10000 y 16= Constantes para cuadrantes laterales.

Resultados y discusión

Análisis de compuestos fitoquímicos de los extractos botánicos

Los extractos botánicos que reaccionaron con el reactivo Mayer para determinar la presencia de alcaloides fueron quinua, neem y chocho (tabla 14). En la tabla 15 se observa que la concentración más alta de polifenoles totales expresados en ácido gálico es clavo de olor (7,3 mg AGE/g), en comparación con el extracto de canela y la concentración de flavonoides del extracto de Neem fue de 106,77 mg CAE/L. En la tabla 16 se presenta el porcentaje de alcaloides totales expresados en lupaninas y saponinas.

Tabla 14

Determinación de alcaloides por colorimetría.

Tipo de extracto	Reactivo Mayer
Canela	(-) Precipitado café
Clavo de Olor	(-) Precipitado café
Quinua	(+) Precipitado blanco amarillento.
Neem	(+) Precipitado blanco amarillento.
Chocho	(+) Precipitado blanco amarillento.

Tabla 15

Determinación de la concentración de polifenoles y flavonoides por espectrofotometría.

Tipo de extracto	Compuestos activos	Concentración
Canela	Polifenoles	6,38 mg AGE/g
Clavo de Olor	Polifenoles	7,3 mg AGE/g

Tipo de extracto	Compuestos activos	Concentración
Neem	Flavonoides	106,77 mg CAE/L

Tabla 16

Determinación del porcentaje de Lupaninas y Saponinas.

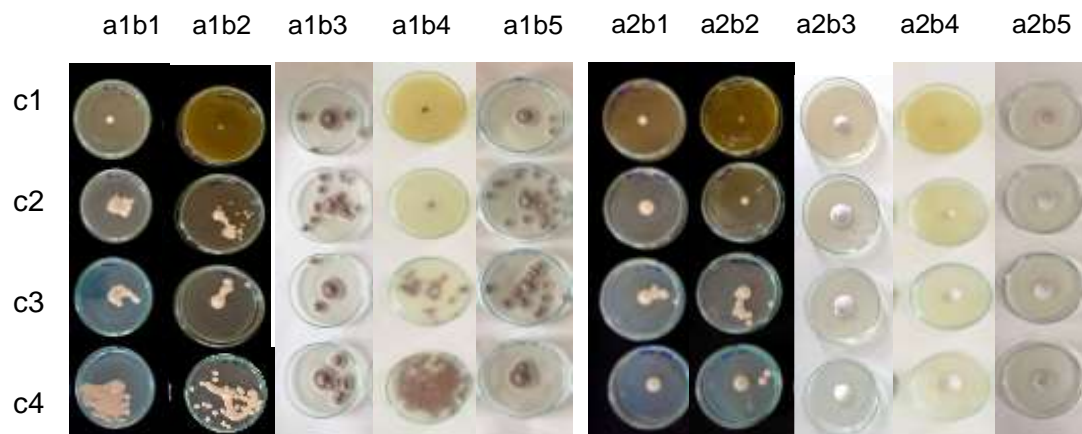
Tipo de extracto	Compuestos activos	Porcentaje
Chocho	Lupanina	1,49 %
Quinoa	Saponina	0,41 %

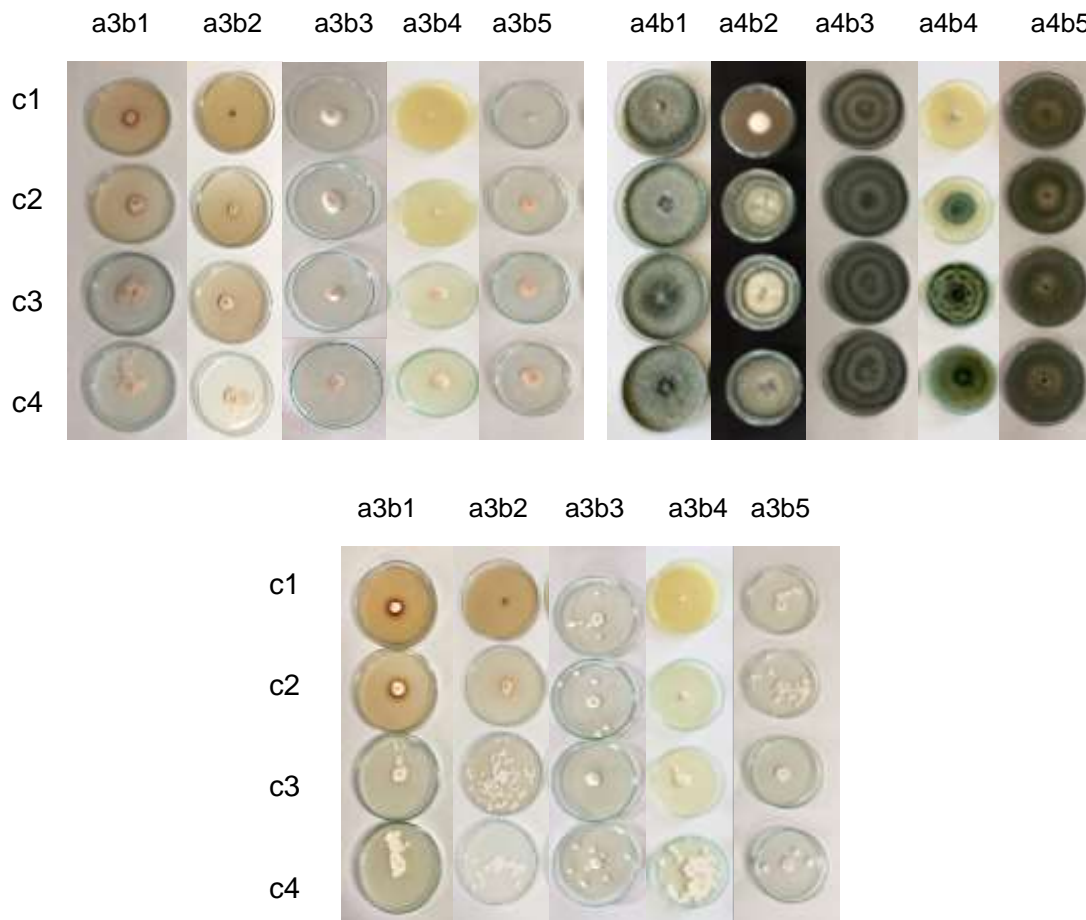
Efectos de inhibición

Los extractos botánicos de canela (b1), clavo de olor (b2) y neem (b4) inhiben el crecimiento micelial de los hongos nematofagos (a1, a2, a3, a4 y a5), principalmente en las diluciones del 10 y 5% (c1,c2), mientras que, las diluciones del 1% (c3) se asemejan a los controles (c4). Sin embargo, en los extractos de quinua (b3) y chocho (b5) para todas sus diluciones se pudo observar que no produjeron efectos inhibitorios a excepción del hongo *Trichothecium* (a3) (figuras 6 y 7).

Figura 6

Crecimiento radial de los hongos nematofagos.



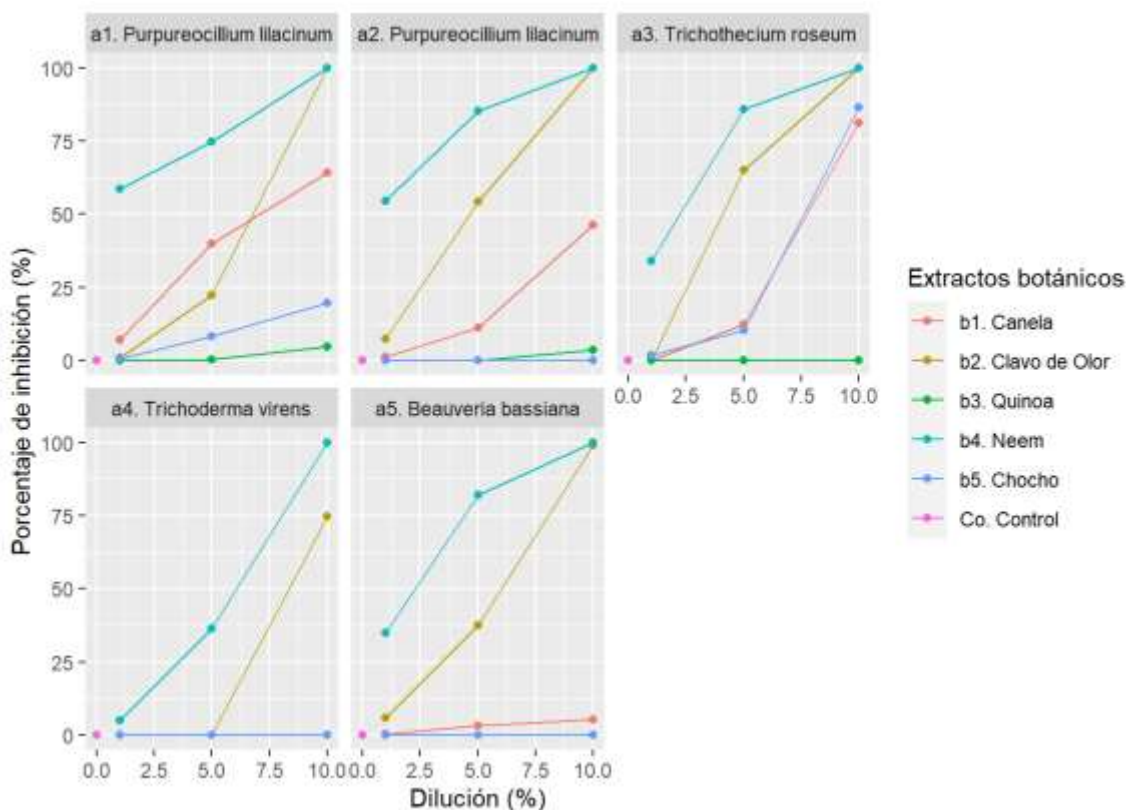


Nota. Efectos de inhibición en el crecimiento radial de los hongos nematofagos frente a diferentes diluciones de extractos botánicos a los 7 días.

En la figura 6, se visualiza que el extracto de neem y clavo de olor principalmente al 10% presentó mayor inhibición a diferencia del extracto de quinoa que no mostró inhibición en las diluciones del 1% y 5%, también, es evidente que el crecimiento de los hongos en el extracto de quinoa no se ve afectado, esto puede deberse al contenido de macro y micronutrientes que son característicos del extracto de quinoa (Velázquez-Mendoza et al., 2017), aunque se conoce que algunos derivados de saponina más hidrófobos reaccionan fácilmente con las membranas celulares y mejoran la actividad biológica de los hongos (Sun et al., 2019).

Figura 7

Efectos de inhibición de los hongos nematofagos.



Nota. Se puede visualizar que a mayor concentración del extracto el porcentaje de inhibición es alto a excepción del extracto de quinoa en todos los hongos y el extracto de chocho en a2. *P. lilacinum*.

Porcentaje de inhibición

El valor que se obtuvo en la prueba de Kolmogorov-Smirnov al 5% fue de $2.2e-16$ lo que demuestra que no existe normalidad en los datos, con lo que se concluye que, no se cumplieron los supuestos de homocedasticidad. Además, en los resultados del análisis de *Kruskal-Wallis* al 5% de la tabla 17, demostraron que existió diferencia significativa para las interacciones (A*C) (Hongos nematofagos* Diluciones de los extractos botánicos).

Tabla 17

Evaluación de los tratamientos por Kruskal-Wallis al 5%.

Hongo	Diluciones de los extractos	Chisq	P-valor
a1: <i>P. lilacinum</i>	10%	23.53	9.90E-05
a1: <i>P. lilacinum</i>	5%	23.25	1.13E-04
a1: <i>P. lilacinum</i>	1%	23.10	1.21E-04
a2: <i>P. lilacinum</i>	10%	23.67	9.29E-05
a2: <i>P. lilacinum</i>	5%	23.46	1.02E-04
a2: <i>P. lilacinum</i>	1%	22.36	1.70E-04
a3: <i>T. roseum</i>	10%	23.63	1.44E-04
a3: <i>T. roseum</i>	5%	23.42	1.04E-04
a3: <i>T. roseum</i>	1%	23.64	9.40E-05
a4: <i>T. virens</i>	10%	23.77	8.86E-05
a4: <i>T. virens</i>	5%	23.69	9.18E-05
a4: <i>T. virens</i>	1%	23.65	9.34E-05
a5: <i>B. bassiana</i>	10%	23.18	1.16E-04
a5: <i>B. bassiana</i>	5%	23.50	1.00E-04
a5: <i>B. bassiana</i>	1%	22.16	1.86E-04

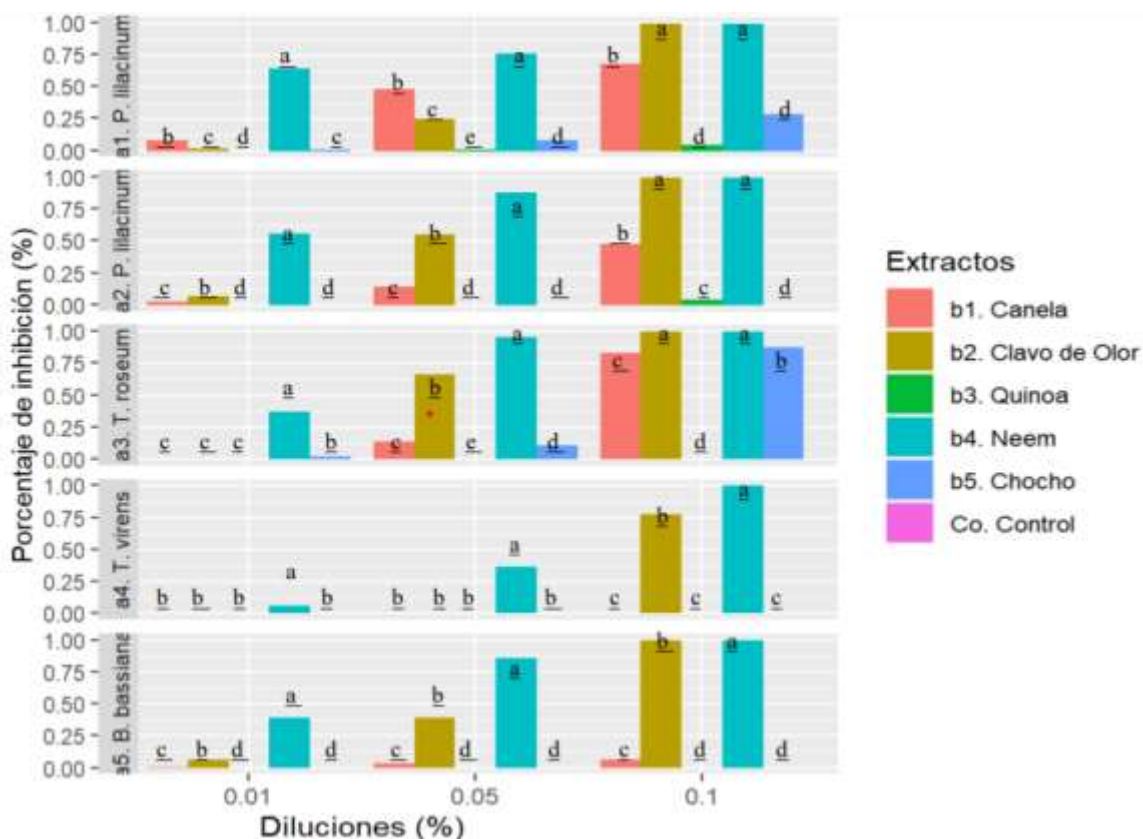
En la figura 8, se indican los resultados del porcentaje de inhibición con los grupos independientes en las interacciones de los hongos nematofagos con las diluciones de los extractos botánicos (A*B*C), en la cual se obtuvo un valor más alto en el grupo A (a1b4c1, a2b4c1, a3b4c1) correspondientes a los tratamientos T10 (*P. lilacinum* + Neem + Dilución 10%), T26 (*P. lilacinum* + Neem + Dilución 10%) y T42 (*Trichoderma viren* + Neem + Dilución 10%).

Por otro lado, se obtuvieron los valores más bajos de los tratamientos en el grupo D (a1b3c3, a2b3c3, a5b3c3), pertenecientes a los tratamientos T9 (*P. lilacinum* +

quinoa + Dilución 1%), T25 (*P. lilacinum* + quinoa + Dilución 1%) y T74 (*B. bassiana* + Quinoa + Dilución 1%), en el grupo C (a3b3c3) del tratamiento T41 (*Trichoderma viren* + Quinoa + Dilución 1%) y en el grupo B (a4b3c3) con el tratamiento T58 (*T. virens* + Quinoa + Dilución 1%).

Figura 8

Determinación de la interacción de grupos independientes para el porcentaje de inhibición.



El extracto *Azadirachta indica* (neem) presentó porcentajes de inhibición altos en todas las diluciones, principalmente al 10% en donde existió 100% de inhibición en todas las especies de hongos probadas en el ensayo, estos resultados concuerdan con Mahmoud et al. (2011) que demostró el efecto inhibitorio en concentraciones de 5, 10, 15 y 20% del extracto acuoso de Neem en cuatro especies de *Aspergillus*.

Grewal & Grewal (1988), también evidenciaron el efecto tóxico del extracto en 19 hongos incluyendo, *Trichoderma viridae*, *G. roseum* y *F. roseum*. La actividad antifúngica del Neem es atribuida a la presencia de compuestos activos de triterpenos o limonoides como meliantriol, azadiractina, quercetina, sitosterol, nimbin, nimbinin, nimbidin, y nimbosterol, pero también a diferentes sustancias amargas como alcaloides y fenoles (Mahmoud et al., 2011).

El extracto de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) presentó valores de inhibición del 100% en *P. lilacinum*, *T. roseum* y *B. bassiana* a una dilución del 10%, varias investigaciones demuestran la propiedad antifúngica que posee el clavo de olor, se sabe que el aceite esencial de clavo inhibe el crecimiento de *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *F. chrysogenum* y *Penicillium spp.* desde una concentración de 500 ppm (Muñoz Castellanos et al., 2020). El extracto acuoso ha mostrado actividad antifúngica en concentraciones de 1%, 3% y 5% frente a *F. oxysporum*, donde al 5% no existió crecimiento micelial (Acedo-Zegarra et al., 2020).

Los resultados de la inhibición provocada por el extracto de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) son consistentes con estudios anteriores. Tran et al., (2020) comprobó que la concentración fungicida mínima del aceite esencial para cepas de *C. albicans* y *C. Auris* está por debajo del 0,03 %, también, evidenciaron cambios morfológicos, daño en la membrana celular e inhibición en la formación de hifas, del mismo modo Isaura Cáceres et al. (2013) determinó que la concentración del extracto acuoso tiene actividad antifúngica desde 500 ppm (0,05%) en *F. oxysporum*, *G. candidum*, *Trichoderma spp.*, *P. digitatum* y *A. niger*.

En cuanto al extracto de *Chenopodium quinoa* (quinoa) presentó valores de 0% de inhibición para todos los hongos en diluciones de 1 y 5%, estos resultados son

comparables con los obtenidos por Stuardo & San Martín (2008) al evaluar que las saponinas del extracto de quinua sin tratamiento alcalino no mostraron actividad en el crecimiento micelial de *B. cinerea* incluso en la concentración más alta (7 mg/ml) tal como Woldemichael & Wink (2001) que evaluaron 16 saponinas provenientes de las semillas de quinua las cuales no presentaron inhibición en *C. albicans* en ninguna de las concentraciones probadas (1, 25, 50, 100 y 500 µg/mL).

También, el extracto de *Lupinus mutabilis* (chocho) presentó inhibición baja en los aislados de *P. lilacinum* y *T. roseum*, no obstante Zamora et al. (2008) evaluaron el extracto de *Lupinus* en *S. rolfsii*, *R. solani* y *F. oxysporum* a una concentración de 1 mg mL⁻¹ obteniendo porcentajes de inhibición de 72.5% y 87.7% respectivamente, mientras que De la Cruz et al. (2016) reportó inhibición del 83.6% en *M. roreri* con el extracto de semillas de *Lupinus spp* a 10 mg mL⁻¹.

Capacidad de esporulación

Se obtuvo un valor de 2.2e-16 en la prueba de Kolmogorov-Smirnov, lo que indicó que no existió normalidad en los datos. En la figura 9 se muestra el efecto en la esporulación de los hongos nematófagos dependiendo del extracto y dilución, donde se demuestra que existe más esporulación en la dilución del 10% y menor al 1% a los 14 días del cultivo.

En la tabla 18, se indican los resultados del porcentaje de inhibición con los grupos independientes en las interacciones de los hongos nematófagos con las diluciones de los extractos botánicos (A*B*C), en la cual se obtuvieron valores variables, donde los resultados con valores más altos se encuentran en el grupo A (a1b4c1, a1b2c2, a1b1c3, a2b4c1, a2b5c2, a2b5c3, a3b1c1, a3b2c2, a3b2c3, a4b2c1, a4b3c1, a4b3c2, a4b3c3, a5b1c1, a5b2c1, a5b5c1, a5b5c2, a5b1c3), mientras que los más bajos

se encuentran en el grupo E (a2b2c1, a2b3c2, a2b4c3, a3b3c2, a3b3c3, a4b2c3, a5b3c2, a5b3c1).

Tabla 18

Grupos independientes formados en la variable capacidad de esporulación.

Hongos nematófagos (A)	Diluciones (C)	Extractos botánicos (B)	Capacidad de esporulación
<i>P. lilacinum</i>	10%	Canela	6,35E+07 D
		Clavo de olor	0 E
		Quinua	1,13E+08 C
		Neem	2,33E+08 A
		Chocho	1,44E+08 B
<i>P. lilacinum</i>	5%	Canela	9,98E+07 C
		Clavo de olor	1,48E+08 A
		Quinua	4,73E+07 D
		Neem	1,03E+08 C
		Chocho	1,09E+08 B
<i>P. lilacinum</i>	1%	Canela	9,97E+07 A
		Clavo de olor	6,35E+07 B
		Quinua	1,74E+07 C
		Neem	1,80E+07 C
		Chocho	1,85E+07 C
<i>P. lilacinum</i>	10%	Canela	1,08E+08 B
		Clavo de olor	0 E
		Quinua	5,83E+07 D
		Neem	2,47E+08 A
		Chocho	8,67E+07 C
<i>P. lilacinum</i>	5%	Canela	4,72E+07 C
		Clavo de olor	7,13E+07 B
		Quinua	2,78E+07 E
		Neem	3,60E+07 D
		Chocho	7,41E+07 A
<i>P. lilacinum</i>	1%	Canela	6,61E+07 B
		Clavo de olor	6,92E+06 D
		Quinua	1,04E+07 B
		Neem	5,83E+06 E
		Chocho	6,80E+07 A
<i>T. roseum</i>	10%	Canela	9,52E+06 A
		Clavo de olor	0 C
		Quinua	6,16E+06 B

Hongos nematófagos (A)	Diluciones (C)	Extractos botánicos (B)	Capacidad de esporulación
<i>T. roseum</i>	5%	Neem	6,40E+06 B
		Chocho	6,40E+06 B
	1%	Canela	8,72E+06 B
		Clavo de olor	1,48E+08 A
		Quinoa	2,18E+06 E
		Neem	5,32E+06 C
<i>T. roseum</i>	1%	Chocho	3,68E+06 D
		Canela	7,84E+06 B
		Clavo de olor	6,35E+07 A
		Quinoa	5,16E+05 E
		Neem	9,96E+05 C
<i>T. virens</i>	10%	Chocho	9,12E+05 D
		Canela	8,56E+07 C
		Clavo de olor	1,69E+08 AB
		Quinoa	1,82E+08 A
		Neem	1,27E+08 B
<i>T. virens</i>	5%	Chocho	8,29E+07 C
		Canela	6,88E+07 A
		Clavo de olor	2,78E+07 C
		Quinoa	6,91E+07 A
		Neem	4,29E+07 B
<i>T. virens</i>	1%	Chocho	2,28E+07 D
		Canela	9,02E+07 A
		Clavo de olor	6,15E+06 E
		Quinoa	2,17E+07 B
		Neem	8,00E+06 D
<i>B. bassiana</i>	10%	Chocho	1,13E+07 C
		Canela	1,41E+08 A
		Clavo de olor	1,29E+08 AB
		Quinoa	1,29E+08 B
		Neem	0 C
<i>B. bassiana</i>	5%	Chocho	1,34E+08 AB
		Canela	5,44E+07 C
		Clavo de olor	4,00E+07 D
		Quinoa	2,95E+07 E
		Neem	6,20E+07 B
<i>B. bassiana</i>	1%	Chocho	8,36E+07 A
		Canela	8,90E+07 A
		Clavo de olor	2,31E+07 B
		Quinoa	8,48E+06 E
		Neem	1,96E+07 C

Hongos nematofagos (A)	Diluciones (C)	Extractos botánicos (B)	Capacidad de esporulación
		Chocho	1,68E+07 D

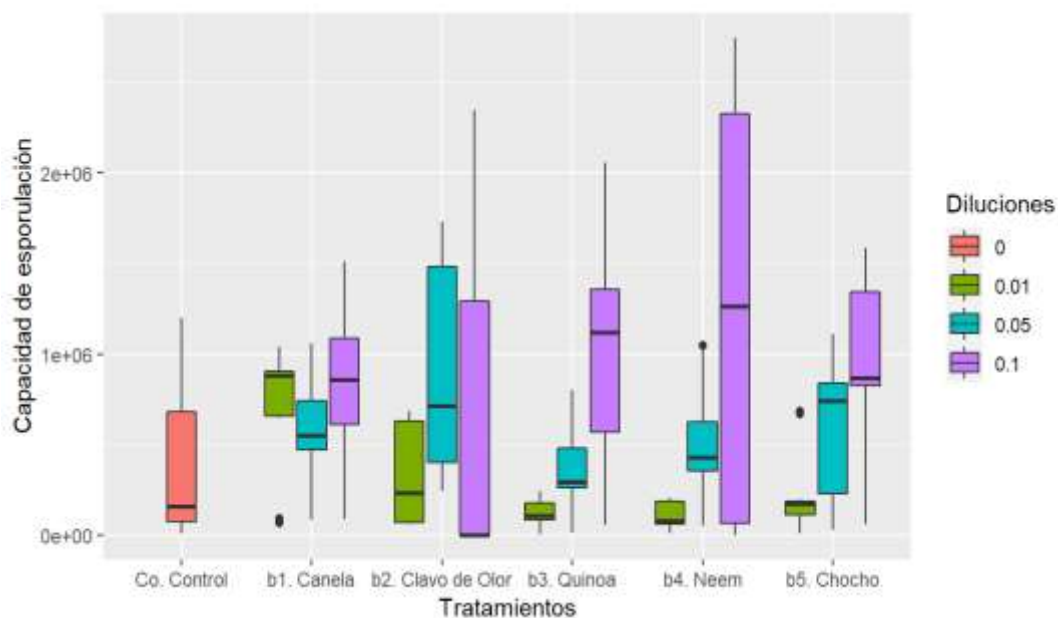
Tabla 19

Evaluación de los tratamientos por Kruskal-Wallis al 5%.

Hongo	Dilución del extracto	Chisq	P-valor
H1: <i>P. lilacinum</i>	10%	23.25	1,13E+05
H1: <i>P. lilacinum</i>	5%	22.07	1,94E+06
H1: <i>P. lilacinum</i>	1%	19.02	7,78E+06
H2: <i>P. lilacinum</i>	10%	23.2	1,13E+05
H2: <i>P. lilacinum</i>	5%	23.07	1,22E+06
H2: <i>P. lilacinum</i>	1%	22.8	1,33E+06
H3: <i>T. roseum</i>	10%	19.07	7,61E+06
H3: <i>T. roseum</i>	5%	23.07	1,22E+06
H3: <i>T. roseum</i>	1%	23.07	1,22E+06
H4: <i>T. virens</i>	10%	19.78	5,51E+06
H4: <i>T. virens</i>	5%	21.93	2,06E+06
H4: <i>T. virens</i>	1%	23.07	1,22E+06
H5: <i>B. bassiana</i>	10%	14.52	5,79E+06
H5: <i>B. bassiana</i>	5%	23.07	1,22E+06
H5: <i>B. bassiana</i>	1%	22.73	1,43E+06

Figura 9

Determinación de la distribución de los datos en la capacidad de esporulación.



El aislamiento de las especies de *Purpureocillium lilacinum* presentaron colonias al principio blancas, tornándose rosas y lilas con el inicio de la esporulación, igual a la investigación de Baron et al. (2020). El aislamiento de la especie de *Trichothecium roseu* presentó colonias de color rosa anaranjado y blanco cuando se esparcen las esporas, al igual que lo mencionado por el estudio de Hamid et al. (2014). Según Wu et al. (2017), la especie *T. virens* presenta un color de esporas verde oscuro, mientras que el color del micelio es blanco al comienzo y verde al final, con similitud a lo observado. Por último, el aislamiento de *B. bassiana* presentó colonias blancas y ligeramente coloreadas de amarillo, en la investigación Oliveira et al. (2011), menciona que tiene una apariencia blanca polvorienta en cuanto a las esporas.

Sin embargo, la capacidad de esporulación en las diluciones de los extractos al 10% resultó afectada por los compuestos activos de los extractos a excepción de los

extractos de quinoa porque presentó un 0,41 % de saponinas y chocho un 1,49% de lupaninas, obteniendo valores relativamente bajos si se compara con otras investigaciones en donde son más altos, como por ejemplo Lim, Park & Yoon (2019), demostraron un valor de 1,26%.de Saponinas y Rodríguez (2009) presentaron un valor de 7,6.% de Lupaninas, por consiguiente, al tener un menor porcentaje de los compuestos activos menor es la actividad antifúngica.

Los polifenoles del extracto de canela (6,38 mg AGE/g) se encuentran dentro del rango descrito (0,42-168,20 mg AGE/g) (Shahidi & Hossain, 2018). La canela tiene una amplia gama de fitoquímicos como eugenol, acetato de eugenol, pero en mayor porcentaje *trans*-cinamaldehído y cinamaldehído (Šernaitė et al., 2020) este compuesto provoca daños en la permeabilidad e integridad de la pared celular (OuYang et al., 2019). Por ende, la actividad antifúngica de la canela se basa en debilitar la pared celular, limitar la formación de pseudohifas e impedir absorber nutrientes para el crecimiento y propagación del hongo (Huang et al., 2019).

El contenido de polifenoles del extracto de clavo de olor (7,3 mg AGE/g), es comparable con el reportado (7,81-310,4 mg AGE/g) para el aceite esencial (Shahidi & Hossain, 2018), por otra parte, Cheng et al. (2008) revelaron que el cinamaldehído, el α -metil cinamaldehído, el ácido (E)-2-metilcinámico, el eugenol, el isoeugenol y otros polifenoles, tienen actividad antifúngica, aunque, Pinto et al. (2009) atribuye al eugenol como el principal compuesto antifúngico del clavo de olor.

Mientras que la cantidad de flavonoides en el extracto de Neem fue alta con un 106,77 mg CAE/L. En la investigación de Venmathi Maran et al. (2021) realizaron un análisis con espectrometría de masas Orbitrap en la que indicaron la presencia de cinco flavonoides para *A. indica* constando los compuestos de miricetina 3-O-galactósido,

trifolina, isorhamnetina, quercetina y kaempferol, así mismo de cuatro compuestos aromáticos y tres fenólicos.

Según el estudio realizado por Mazumder et al. (2021), obtuvieron un mayor contenido fenólico en hojas de *A. indica* con 205,31 mg GAE/g de extracto seco y el nivel más alto de contenido de flavonoides presentaba un 56,04 mg equivalentes de quercetina /100 g de extracto. Esto indica que al ser un extracto con distintas variedades de compuestos activos, tiene mayor influencia con actividades antifúngicas y provoca menor compatibilidad con los hongos nematófagos.

Capítulo VI

Fase 3: Establecimiento de la interacción extracto botánico y hongo nematófago para el control de *M. incognita*.

Los hongos nematófagos infectan a los nematodos fitoparásitos a través de una serie de acciones, mientras que, algunos extractos botánicos liberan sustancias que pueden ser tóxicos para los nemátodos fitoparásitos, por ello, en el presente ensayo se evaluó la interacción entre extractos botánicos y hongos nematofagos contra diferentes estadios de *M. incognita* en condiciones controladas, donde se evidenció el efecto de los factores a diferentes horas, para J2 se evaluó a las 24, 48 y 72 h, mientras que para huevos se evaluó a las 72, 96 y 120 h.

Metodología

Filtrados de hongos nematófagos

Se hicieron tres lavados con ADE y una espátula al micelio fúngico cultivado en el medio PDA. Luego, el líquido se colocó en un frasco de vidrio esteril, se agitó por 5 min. y se filtró con gasas estériles. Después, según el método descrito por Arrieta et al. (2009), se hicieron diluciones de 1/10; 1/100 en tubos de ensayo, se realizó vortex por 3 minutos y se calculó la concentración de conidios con la fórmula ajustada por Gómez et al. (2014).

Obtención del inóculo de *M. incognita*

El inóculo del nematodo se obtuvo a partir de raíces de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) infectadas por *M. incognita*. El procedimiento se realizó según lo descrito por Hussey (1973), las raíces se cortaron en secciones de 1 cm y se licuaron con NaClO al 0,5% a velocidad máxima por 10 s con 5 s de pausa y 10 s más de licuado. Luego, se

pasó el contenido por tamices de 74 μm y 25 μm , se lavó con dH₂O y el sobrenadante del tamiz de 25 μm se dividió en dos volúmenes. El primer volumen, se incubó por 72 h en una bandeja de Oostenbrink para la obtención de juveniles (J2) de *M. incognita*. En el segundo volumen, se obtuvieron los huevos de *M. incognita* y se contabilizó con el microscopio invertido en placas de cultivo celular.

Prueba del efecto nematicida en huevos y juveniles (J2) de *M. incognita*

En los pocillos de las placas de cultivo celular, se colocó 50 huevos o juveniles (J2) de *M. incognita*, 250 μL de la dilución al 5% de los extractos botánicos, los filtrados fúngicos a una concentración de $1,5 \times 10^6$, 500 μL de la solución de estreptomycin y ADE hasta completar los 5 mL por pocillo. Después, las placas se incubaron a 25°C por 7 días (Saytandra Singh et al., 2013). También, se realizaron controles de los extractos botánicos, controles de los hongos nematófagos y controles con ADE.

Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental completamente al azar (AxB) con 5 niveles en los factores A y B, descritos en la tabla 20.

Tabla 20

Factores y niveles que se evaluaron en la fase 3.

Hongos nematófagos (A)	Extractos botánicos (B)
a1. <i>P. lilacinum</i>	b1. Extracto de canela
a2. <i>P. lilacinum</i>	b2. Extracto de clavo de olor
a3. <i>T. roseum</i>	b3. Extracto de Quinoa
a4. <i>T. virens</i>	b4. Extracto de neem
a5. <i>B. bassiana</i>	b5. Extracto de Chocho

Hongos nematófagos (A)	Extractos botánicos (B)
a0. Control hongo	b0. Control extracto

Tratamientos a comprobar

Se realizaron 5 observaciones para cada uno de los tratamientos (tabla 21).

Tabla 21

Tratamientos para evaluar las interacciones que tienen un efecto nematocida y/o nematostático.

Nº Tratamiento	Tratamientos	Descripción
T1	a1b1	<i>P. lilacinum</i> + Canela
T2	a1b2	<i>P. lilacinum</i> + Clavo de olor
T3	a1b3	<i>P. lilacinum</i> + Quinoa
T4	a1b4	<i>P. lilacinum</i> + Neem
T5	a1b5	<i>P. lilacinum</i> + Chocho
T6	a2b1	<i>P. lilacinum</i> + Canela
T7	a2b2	<i>P. lilacinum</i> + Clavo de olor
T8	a2b3	<i>P. lilacinum</i> + Quinoa
T9	a2b4	<i>P. lilacinum</i> + Neem
T10	a2b5	<i>P. lilacinum</i> + Chocho
T11	a3b1	<i>T. roseum</i> + Canela
T12	a3b2	<i>T. roseum</i> + Clavo de olor
T13	a3b3	<i>T. roseum</i> + Quinoa
T14	a3b4	<i>T. roseum</i> + Neem
T15	a3b5	<i>T. roseum</i> + Chocho
T16	a4b1	<i>T. virens</i> + Canela
T17	a4b2	<i>T. virens</i> + Clavo de olor

Nº Tratamiento	Tratamientos	Descripción
T18	a4b3	<i>T. virens</i> + Quinoa
T19	a4b4	<i>T. virens</i> + Neem
T20	a4b5	<i>T. virens</i> + Chocho
T21	a5b1	<i>B. bassiana</i> + Canela
T22	a5b2	<i>B. bassiana</i> + Clavo de olor
T23	a5b3	<i>B. bassiana</i> + Quinoa
T24	a5b4	<i>B. bassiana</i> + Neem
T25	a5b5	<i>B. bassiana</i> + Chocho
T26	a1b0	<i>P. lilacinum</i>
T27	a2b0	<i>P. lilacinum</i>
T28	a3b0	<i>T. roseum</i>
T29	a4b0	<i>T. virens</i>
T30	a5b0	<i>B. bassiana</i>
T31	a0b1	Canela
T32	a0b2	Clavo de olor
T33	a0b3	Quinoa
T34	a0b4	Neem
T35	a0b5	Chocho
T36	a0b0	Control

Unidades experimentales

La unidad experimental consistió en pocillos con 50 nematodos en estado juvenil (J2) y 50 huevos de *M. incognita* en los cuales se evaluó la interacción entre los factores.

Tipo de diseño

Se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 6x6 con 35 tratamientos y 5 repeticiones.

Análisis estadístico

Se analizaron los supuestos de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov al 5%. Las variables que cumplieron estos supuestos, fueron tratados con un análisis de varianza (ANOVA) al 5%, caso contrario se trataron con un análisis de varianza robusto al 5%, también se hizo la prueba de Tukey para determinar diferencias entre medias. El análisis se realizó con el software estadístico R 3.3.1.

Análisis de efecto nematostático

Tabla 22

Esquema del análisis de varianza para evaluar las interacciones de extracto botánico y hongo nematófago en el control de M. incognita.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Observaciones	4
Hongos nematófagos	5
Extractos botánicos	5
Hongos x Extractos	25
Error Experimental	144
TOTAL	179

Variables a evaluar

a. Eclosión de huevos de *M. incognita*

Utilizando un microscopio invertido se contabilizó los huevos eclosionados y no eclosionados a las 72, 96 y 120 h de exposición con los tratamientos, según el método descrito por Alejo et al., (2018). Luego, se usó la fórmula de Vincent (1947), para obtener el porcentaje de eclosión:

$$\%inhibición = \frac{ET - EC}{EC} \times 100$$

$$\%Eclosión: 100 - \%inhibición$$

Donde:

ET: % Eclosión en los tratamientos

EC: % Eclosión en los controles

b. Mortalidad en juveniles (J2) de *M. incognita*

Se determinó según el método descrito por Saytandra Singh et al. (2013), con un microscopio invertido se contabilizó los juveniles muertos después de 24, 48 y 72 h de exposición con los tratamientos. Luego, se usó la fórmula corregida de Abbott (1925), para obtener el porcentaje de mortalidad:

$$\%mortalidad = \frac{MT - MC}{100 - MC} \times 100$$

Donde:

MT: % Mortalidad en el tratamiento

MC: % Mortalidad en el control

Resultados y discusión

Porcentaje de eclosión de huevos de *M. incognita*

Los resultados en la prueba de Kolmogorov-Smirnov al 5% para la evaluación a las 72 horas, se obtuvo un p-value = $7.853e-06$, mientras que a las 96 horas se obtuvo un p-value = 0.0002859, por lo tanto, los datos no presentan una distribución normal y frente a esto se procedió a realizar el ANOVA robusto (tabla 23 y 24). En cambio, a las 120 horas se obtuvo un p-value = 0.0718, lo que representa una distribución normal y se realizó el ANOVA (tabla 25). Sin embargo, en los análisis de varianza se obtuvieron diferencias altamente significativas para los factores A (Hongos nematofagos), factor B (Extractos botánicos) e interacción A*B (Hongos nematofagos * Extractos botánicos).

Tabla 23

Análisis de varianza para la variable eclosión de huevos de M. incognita a las 72 h.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Hongos nematofagos	1272.61	5	254.52	150.82	2e-16***
B: Extractos botánicos	1487.79	5	297.55	176.32	2e-16***
A*B	517.54	25	20.70	12.26	2e-16***
Residuos		144			

Tabla 24

Análisis de varianza para la variable eclosión de huevos de M. incognita a las 96 h.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Hongos nematófagos	1481.198	5	296.23	236.79	2e-16***
B:Extractos botánicos	1697.470	5	339.49	271.36	2e-16***
A*B	609.389	25	24.37	19.48	2e-16***
Residuos		144			

Tabla 25

Análisis de varianza para la variable eclosión de huevos de M. incognita a las 120 h.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Hongos nematófagos	33504	5	6701	320.727	2e-16***
B:Extractos botánicos	29754	5	5951	284.827	2e-16***
A*B	4915	25	197	9.411	2e-16***
Residuos		144			

En la tabla 26, se indican los resultados de tukey ($p < 0,05$) con los grupos independientes de las interacciones de los hongos nematofagos con la dilución al 5% de los extractos botánicos (A*B). El menor porcentaje de eclosión de los huevos a las 72 horas, se muestran en el grupo M (a5b3, a1b2, a1b3, a4b2, a4b4, a4b3,) que pertenecen a los tratamientos T23 (*B. bassiana* + Quinoa), T2 (*P. lilacinum 1* + Clavo de olor), T3 (*P. lilacinum 1* + Quinoa) , T17 (*T. virens* + Clavo de olor), T19 (*T. virens* +

Neem) y T18 (*T. virens* + Quinoa), con las cifras de 5.23 %, 8.51%, 8.54%, 8.67%, 9.27%, 12.55%, respectivamente.

Después a las 96 horas, se presentaron en el grupo L (a4b4, a4b2, a5b3, a1b2, a1b3, a3b4) de los tratamientos T19 (*T. virens* + Neem), T17 (*T. virens* + Clavo de olor), T23 (*B. bassiana* + Quinoa), T18 (*T. virens* + Quinoa), T2 (*P. lilacinum 1* + Clavo de olor) y T3 (*P. lilacinum 1* + Quinoa), con cifras de 3.41, 4.34, 6.25, 6.73, 10.59, 11.52 respectivamente

Y finalmente a las 120 horas, se obtuvieron en el grupo S (a4b4, a4b2, a4b3, a5b3, a1b3, a1b2) pertenecientes a los tratamientos T19 (*T. virens* + Neem), T17 (*T. virens* + Clavo de olor), T18 (*T. virens* + Quinoa), T23 (*B. bassiana* + Quinoa), T3 (*P. lilacinum 1* + Quinoa) y T2 (*P. lilacinum 1* + Clavo de olor), con cifras de 3.58, 5.42, 5.967, 7.85, 14,47, 14,27 respectivamente.

Tabla 26

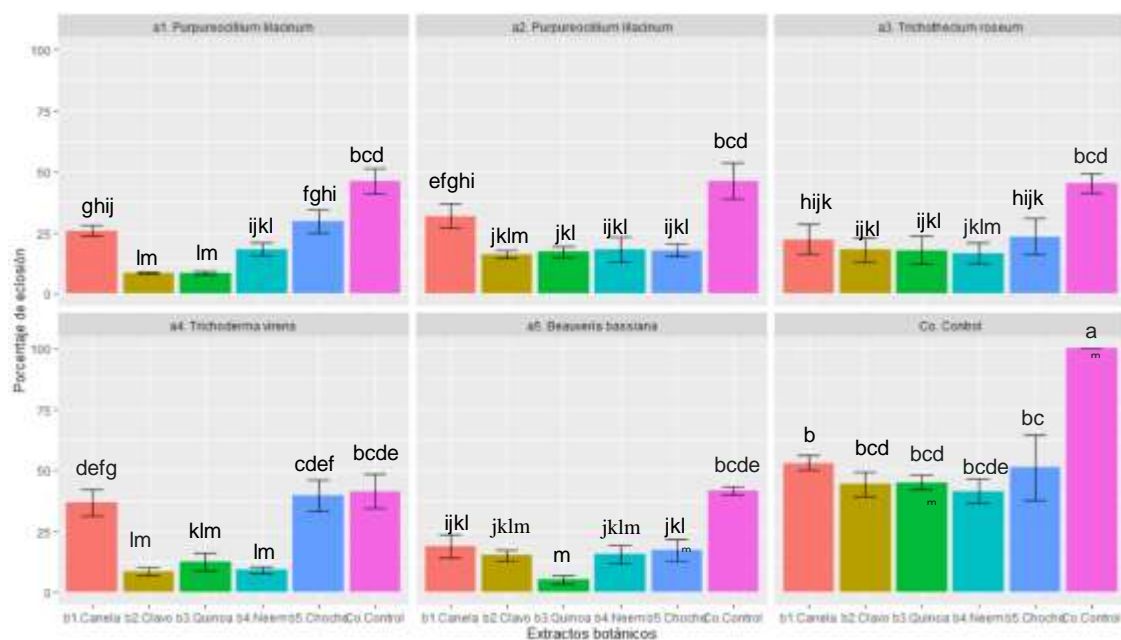
Resultado del análisis de Tukey ($p < 0,05$) para los tratamientos en la variable porcentaje de eclosión de los huevos

Nº	Tratamiento	72 horas	96 horas	120 horas
T1	<i>P. lilacinum 1</i> + Canela	25.86 GHIJ	35.41 EFG	37.27 FGHIJ
T2	<i>P. lilacinum 1</i> + Clavo	8.512 LM	10.59 JKL	14.47 PQRS
T3	<i>P. lilacinum 1</i> + Quinoa	8.543 LM	11.52 IJKL	14.27 QRS
T4	<i>P. lilacinum 1</i> + Neem	18.20 IJKL	21.38 HI	34.11 GHIJK
T5	<i>P. lilacinum 1</i> + Chocho	29.55 FGHI	35.65 EF	41.86 EFGH
T6	<i>P. lilacinum 2</i> + Canela	31.81 EFGH	36.75 EF	44.82 DEFG
T7	<i>P. lilacinum 2</i> + Clavo	16.08 JKLM	24.77 GH	25.72 KLMNOP
T8	<i>P. lilacinum 2</i> + Quinoa	17.23 JKL	26.55 FGH	28.15 JKLMNO
T9	<i>P. lilacinum 2</i> + Neem	18.25 IJKL	24.02 H	31.42 HIJKLM
T10	<i>P. lilacinum 2</i> + Chocho	17.85 IJKL	24.72 GH	40.47 EFGHI
T11	<i>T. roseum</i> + Canela	22.25 HIJK	26.46 EFG	28.52 JKLMNO
T12	<i>T. roseum</i> + Clavo	17.91 IJKL	19.46 HIJ	23,69 KLMNOPQ
T13	<i>T. roseum</i> + Quinoa	17.81 IJKL	18.71 HIJ	20.37 MNOPQ
T14	<i>T. roseum</i> + Neem	16.58 JKLM	19.21 HIJ	21.94 LMNOQ
T15	<i>T. roseum</i> + Chocho	23.34 HIJK	26.84 FGH	29.02 JKLMN
T16	<i>T. virens</i> + Canela	36.81 DEFG	35.82 EF	31.74 HIJKL
T17	<i>T. virens</i> + Clavo	8.67 LM	4.34 L	5.428 S
T18	<i>T. virens</i> + Quinoa	12.55 KLM	6.73 KL	5.967 S

Nº	Tratamiento	72 horas	96 horas	120 horas
T19	<i>T. vires</i> + Neem	9.27 LM	3.41 L	3.586 S
T20	<i>T. vires</i> + Chocho	39.74 CDEF	35.10 EFG	31.18 HIJKLM
T21	<i>B. bassiana</i> + Canela	18.93 IJKL	21.43 HI	29.31 IJKLM
T22	<i>B. bassiana</i> + Clavo	15.17 JKLM	16.81 HIJK	17.76 NOPQR
T23	<i>B. bassiana</i> + Quinoa	5.237 M	6.25 KL	7.856 RS
T24	<i>B. bassiana</i> + Neem	15.66 JKLM	16.84 HIJK	17.52 OPQR
T25	<i>B. bassiana</i> + Chocho	17.36 JKL	21.29 HIJ	29.37 IJKLM
T26	<i>P. lilacinum 1</i>	46.15 BCD	53.67 BC	51.45 CDE
T27	<i>P. lilacinum 2</i>	44.22 BCD	54.12 B	57.72 BC
T28	<i>T. roseum</i>	45.21 BCD	49.70 BCD	51.08 CDE
T29	<i>T. vires</i>	41.50 BCDE	39.32 DE	32.45 HIJKL
T30	<i>B. bassiana</i>	41.78 BCDE	49.33 BCD	51.45 CDE
T31	Canela	53.04 B	55.94 B	59.08 BC
T32	Clavo de olor	44.35 BCD	49.37 BCD	51.32 CDE
T33	Quinoa	45.11 BCD	47.67 BCD	48.44 CDEF
T34	Neem	41.46 BCDE	43.23 CDE	45.65 DEF
T35	Chocho	51.14 BC	54.72 B	65.00 B
T36	Control	100.00 A	100.00 A	100.00 A

Figura 10

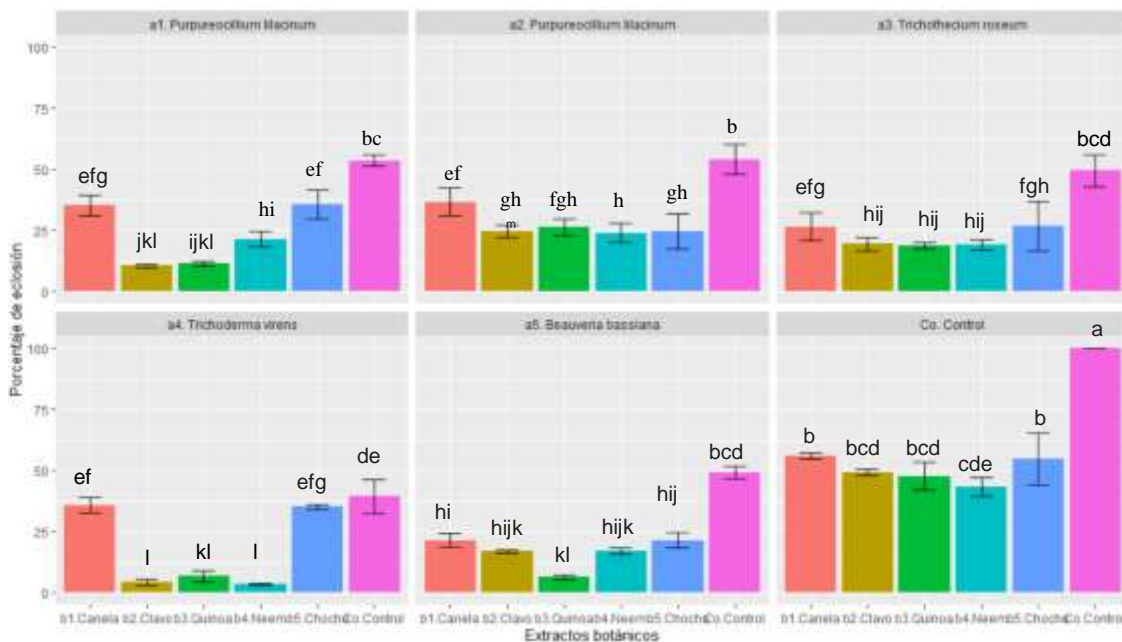
Grupos independientes en el porcentaje de eclosión de *M. incognita* a las 72 h.



Nota. Se puede observar que a las 72 h existe una disminución en el porcentaje de eclosión de los huevos de *M. incognita* en comparación al control, sobre todo en *B. bassiana* y sus interacciones presentan una menor eclosión de huevos en este periodo.

Figura 11

Grupos independientes en el porcentaje de eclosión de M. incognita a las 96 h.

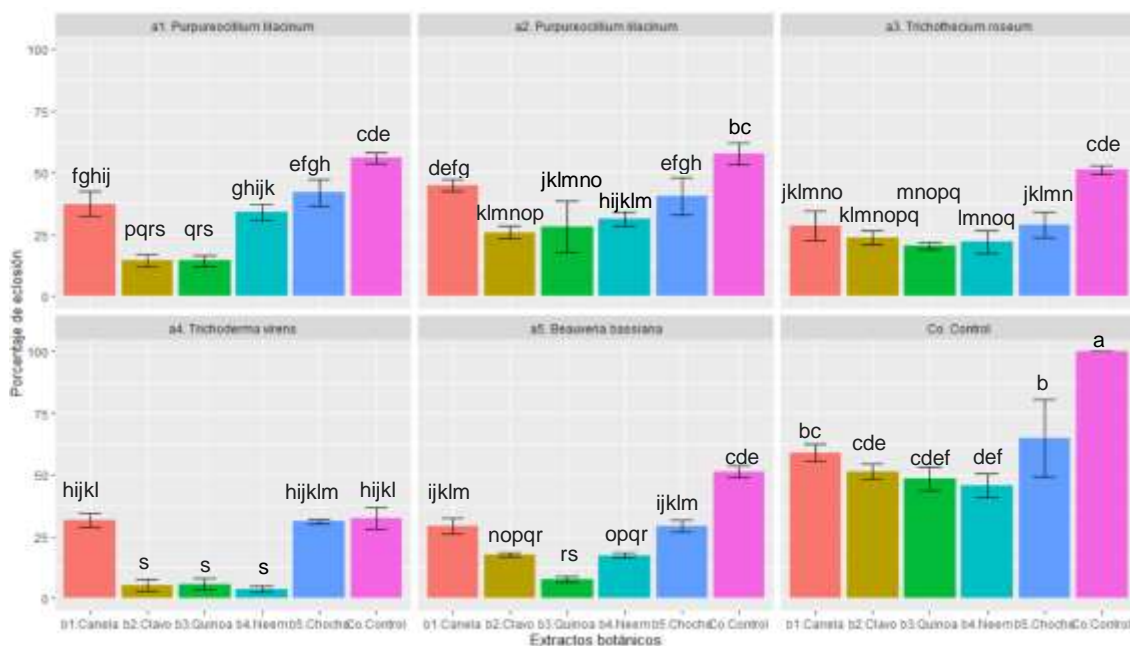


Nota. Se puede observar que a las 96 h el porcentaje de eclosión permanece aún inferior al control, lo que indica que el efecto de los tratamientos se conserva con el transcurso de este periodo.

En la figura 12, se observa específicamente que el efecto de la mayoría de los tratamientos puede retardar la eclosión de los huevos. Sin embargo el efecto de *T. virens* con los extractos de clavo de olor, quinoa y neem, parecen ser prometedores para imposibilitar la eclosión de huevos de *M. incognita*. Además, la acción nematicida es mayor cuando se combinan los extractos botánicos.

Figura 12

Grupos independientes en el porcentaje de eclosión de M. incognita a las 120 h.

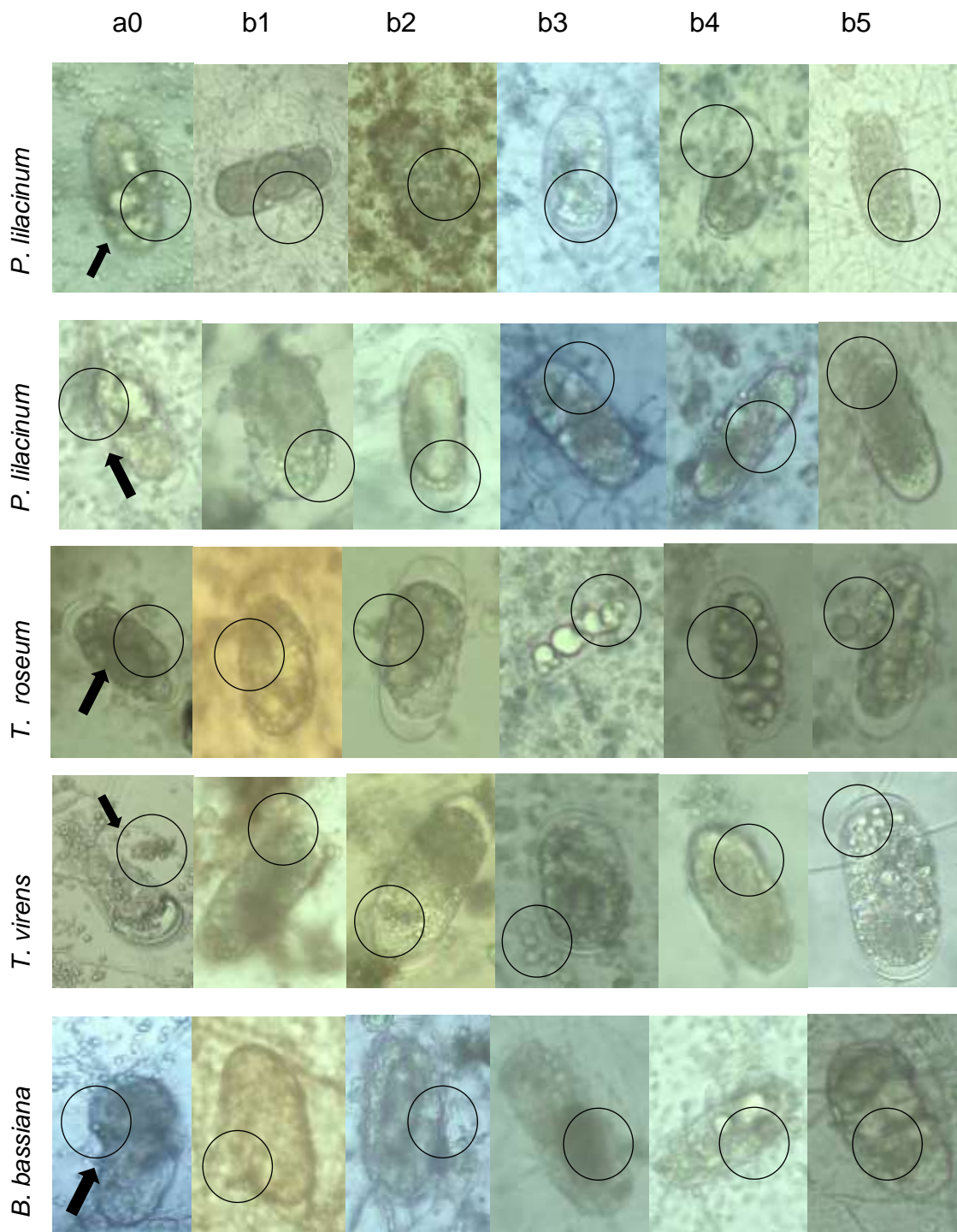


Nota. Se puede observar que a las 120 h el porcentaje de eclosión aumentó en comparación a los 72 y 96 h.

En la figura 13, se observa el modo de acción de la interacción de los hongos nematófagos y extractos botánicos a una dilución del 5% (AxB), sobre los huevos de *M. incognita*. Las principales características que se muestran son las estructuras de infección penetrante y atrapadoras de las hifas con los conidios adheridos en la cubierta del huevo. Además, todos los hongos estudiados fueron capaces de infectar a través del parasitismo alrededor del 50% de los huevos inoculados a las 120 horas.

Figura 13

Actividad de los hongos nematofagos en huevos de M. incognita.



Nota. Método de acción de los hongos nematofagos en los huevos de M. incognita,

fotografía tomada en microscopio invertido Zeiss a 40X.

Los resultados demostraron que existe un menor número de huevos eclosionados en *M. ingconita* para todos los tratamientos analizados con respecto a los controles, indicando que en las interacciones de los hongo nermátofagos con los extractos botánicos presentan actividad nematicida, con un valor más alto en las especies de *T. virens*, *B. bassiana* y *Purpureocillium lilacinum* con los extractos botánicos de quinoa, clavo de olor y Neem.

Según Baron et al. (2020), las esporas de los hongos son estructuras infectivas que se involucran en el proceso de invasión en un huésped y se ha reportado que son capaces de adherirse hasta penetrar en los fitoparásitos de estadio juvenil como en los huevos. En el estudio de Youssef et al. (2020), demostraron el porcentaje de eclosión en *M. incognita* con la especie *B. bassiana* a una concentración de 1×10^6 con valores del 57, 5% para las 72 h y 56% para las 96 h. Mientras que la mejor interacción que se obtuvo en *B. bassiana* con el extracto de quinoa, presentaron un porcentaje menor de eclosión con el 5, 24% a las 72 h y 6, 25% a las 96 h.

Sin embargo, en las mejores interacciones a las 96 h y 120 h se obtuvo en *T. virens* con el extracto de neem presentando los porcentajes del 3.41% y 3. 58%. En el estudio de Fan et al. (2020), determinaron que la eclosión fue del 9, 23%, 22, 50% y 39, 97 % a las 48, 72 y 96 h de exposición con los tratamientos. La cantidad de flavonoides que posee el extracto de *A. indica* es esencial para defender a las plantas contra los insectos y herbívoros, se ha demostrado que puede provocar efectos disuasorios en el comportamiento fisiológico contra los fitoparásitos (Lin et al., 2019).

Además, los metabolitos secundarios que posee el género *Trichoderma spp.* ha demostrado un gran potencial antibacteriano y nematicida, así mismo, las especies de

T. viridae y *T. hamatum* (T21) se ha reportado que sirven de manera eficaz para disminuir la eclosión de los huevos de *M. incognita* con un valor de 28,4 % (Khan et al., 2020).

Por otra parte, en la investigación de de Liang et al. (2020), demostraron que la tasa menor de eclosión de huevos en la especie de *Meloidogyne enterolobii* era *P. lilacinum* PL251 de 40,33 % a los 7 días con una concentración de 1×10^6 conidios/mL. Según Isaac et al. (2021), obtuvieron una eclosión de huevos con 22.8% en *M. incognita* a las 72 horas con el mismo hongo nematófago y Youssef et al. (2020) obtuvieron un 28 % a las 96 horas con la concentración de 1×10^6 .

Por consiguiente, el porcentaje de la interacción para las dos especies de *P. lilacinum* con el extracto de quinoa se obtuvo un mejor valor del 14.27% y 27.98 % después de las 120 horas de exposición con los tratamientos. Y el mecanismo de acción que tiene contra los fitoparásitos es la penetración dirigida de hifas fúngicas con las esporas a través de la cáscara del huevo del nematodo por la activación de la enzima serina proteasa producida por *P. lilacinus* (Youssef et al., 2020).

Porcentaje de mortalidad en juveniles (J2) de *M. incognita*

Los resultados obtenidos en la prueba de Kolmogorov-Smirnov al 5% para la evaluación a las 24 horas fue de 9.148×10^{-8} lo que indica que los datos no tienen una distribución normal, frente a esto se procedió a realizar un ANOVA robusto, a diferencia del resultado a las 48 donde se obtuvo un valor de 0.1395 lo que señala que si existe normalidad en los datos y se realizó un ANOVA, por otra parte, en la evaluación a las 72 horas expresó un valor de 0.0004469 por lo que se entiende que no existe normalidad en los datos y se realizó un ANOVA robusto.

En el análisis de varianza para la evaluación a las 24, 48 y 72 horas, se puede

observar que existe diferencia altamente significativa en el factor A (Hongos nematofagos), Factor B (Extractos botánicos) e interacción A*B (Hongos nematofago* Extractos botánicos) para el control de juveniles (J2) de *M. incognita* a las 24 (Tabla 27) 48 (Tabla 28) y 72 horas (Tabla 29), esto indica que los factores e interacciones tienen influencia en la mortalidad de juveniles de *M. incognita*.

Tabla 27

Análisis de varianza para la variable mortalidad de juveniles (J2) de M. incognita a las 24 h.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Hongos nematofagos	1462.2496	5	292.44992	226.4648	2e-16***
B:Extractos botánicos	1482.3339	5	296.46678	229.5753	2e-16***
A*B	936.0014	25	37.44005	28.9925	2e-16***
Residuos		144			

Tabla 28

Análisis de varianza para la variable mortalidad de juveniles (J2) de M. incognita a las 48 h.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Hongos nematofagos	19142	5	3828	170.44	2e-16***
B:Extractos botánicos	42644	5	8529	379.70	2e-16***
A*B	9804	25	392	17.46	2e-16***
Residuos	3235	144	22		

Tabla 29

Análisis de varianza para la variable mortalidad de juveniles (J2) de M. incognita a las 72 h.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Hongos nematófagos	1536.361	5	307.27224	117.99178	2e-16***
B:Extractos botánicos	3192.150	5	638.43009	245.15558	2e-16***
A*B	1036.671	25	41.46685	15.92317	2e-16***
Residuos		144			

En la tabla 30, se indican los resultados del porcentaje de mortalidad en juveniles de *M. incognita* con los sus grupos independientes, para la evaluación a las 24 horas los valores más altos se presentaron en el grupo A (a4b4, a1b4, a4b3, a1b3, a5b3, a1b2, a5b2,a5b4) que corresponden a los tratamientos T19 (*T. viren* + Neem), T4 (*P. lilacinum* 1 + Neem), T18 (*T. viren* + Quinoa), T3 (*P. lilacinum* 1 + Quinoa), T23 (*B. bassiana* + Quinoa), T2 (*P. lilacinum* 1 + Clavo de olor), T22 (*B. bassiana* + Clavo de olor), T24 (*B. bassiana* + Neem) con valores de 59.15%, 57.95%, 56.85%, 53.50%, 48.68%, 46.65%, 45.85%, 45.82% respectivamente.

Los valores más altos obtenidos a las 48 horas que se muestran en el grupo A (a4b3, a1b4, a4b4, a5b3, a5b2, a2b4, a5b4) que pertenecen a los tratamientos T18 (*T. viren* + Quinoa), T4 (*P. lilacinum* 1 + Neem), T19 (*T. viren* + Neem), T23 (*B. bassiana* + Quinoa), T22 (*B. bassiana* + Clavo de olor), T9 (*P. lilacinum* 2 + Neem), T24 (*B. bassiana* + Neem), con cifras de 78.32%, 75.48%, 74.94%, 69.75%, 66.56%, 64.35%, 63.88% respectivamente.

Finalmente los valores a las 72 horas que presentaron mayor porcentaje de mortalidad aparecen en el grupo A (a5b3, a4b3, a2b4, a5b4, a1b3, a5b2, a1b4, a2b2, a3b3, a2b3, a4b4, a3b4) que corresponden a los tratamientos T23 (*B. bassiana* + Quinoa), T18 (*T. viren* + Quinoa), T9 (*P. lilacinum* 2 + Neem), T24 (*B. bassiana* + Neem), T3 (*P. lilacinum* 1 + Quinoa), T22 (*B. bassiana* + Clavo de olor), T4 (*P. lilacinum* 1 + Neem), T7 (*P. lilacinum* 2 + Clavo de olor), T13 (*T. roseum* + Quinoa), T8 (*P. lilacinum* 2 + Quinoa), T19 (*T. viren* + Neem), T14 (*T. roseum* + Neem), con valores de 96.37%, 93.86%, 91.61%, 91.49%, 90.91%, 90.18%, 88.17%, 85.47%, 85.51%, 84.54%, 81.80%, 80.48% respectivamente.

Tabla 30

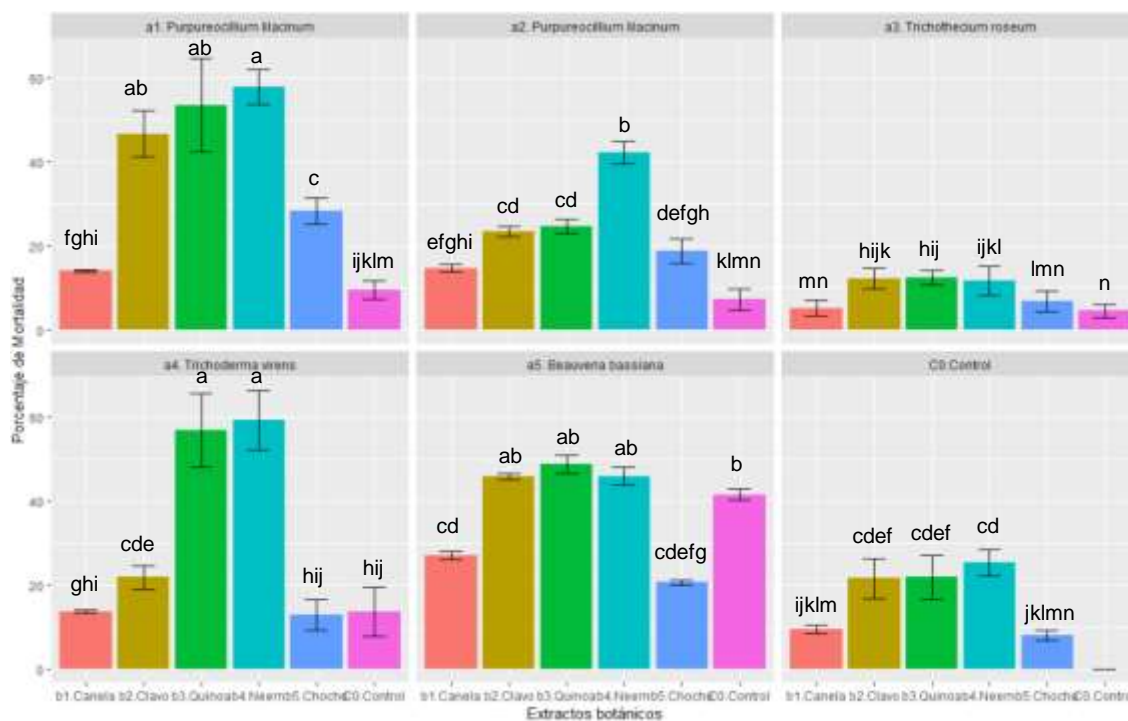
Resultado del análisis de Tukey ($p < 0,05$) para los tratamientos en la variable porcentaje de mortalidad.

Nº	Tratamiento	24 Horas	48 Horas	72 horas
T1	<i>P. lilacinum</i> 1 + Canela	14.11 FGHI	25.33 KLMN	41.50 HIJ
T2	<i>P. lilacinum</i> 1 + Clavo	46.65 AB	57.35 BCDE	76.31 BCD
T3	<i>P. lilacinum</i> 1 + Quinoa	53.50 AB	58.48 BCDE	90.91 ABC
T4	<i>P. lilacinum</i> 1 + Neem	57.95 A	75.48 A	88.17 ABC
T5	<i>P. lilacinum</i> 1 + Chocho	28.41 C	54.28 CDEF	73.92 CDE
T6	<i>P. lilacinum</i> 2 + Canela	14.83 EFGHI	27.08 JKLM	32.57 JKL
T7	<i>P. lilacinum</i> 2 + Clavo	23.48 CD	45.74 EFGH	85.47 ABC
T8	<i>P. lilacinum</i> 2 + Quinoa	24.77 CD	48.48 EFG	84.54 ABC
T9	<i>P. lilacinum</i> 2 + Neem	42.29 B	64.35 ABCD	91.61 ABC
T10	<i>P. lilacinum</i> 2 + Chocho	18.88 DEFGH	37.54 GHIJ	56.52 FG
T11	<i>T. roseum</i> + Canela	5.299 MN	13.55 Q	19.64 NO
T12	<i>T. roseum</i> + Clavo	12.33 HIJK	33.13 IJKL	52.20 FGHI
T13	<i>T. roseum</i> + Quinoa	12.54 HIJ	45.84 EFGH	85.51 ABC
T14	<i>T. roseum</i> + Neem	11.83 IJKL	45.88 EFGH	80.48 ABCD
T15	<i>T. roseum</i> + Chocho	6.855 LMN	28.69 JKLM	59.25 EF
T16	<i>T. virens</i> + Canela	13.68 GHI	20.95 MNOP	29.00 KLM
T17	<i>T. virens</i> + Clavo	21.87 CDE	40.26 GHI	43.86 GHIJ
T18	<i>T. virens</i> + Quinoa	56.85 A	78.32 A	93.86 AB
T19	<i>T. virens</i> + Neem	59.15 A	74.94 A	81.80 ABC
T20	<i>T. virens</i> + Chocho	12.88 HIJ	34.93 HIJK	39.42 IJK
T21	<i>B. bassiana</i> + Canela	26.96 CD	43.07 FGHI	57.04 FG
T22	<i>B. bassiana</i> + Clavo	45.85 AB	66.56 ABC	90.18 ABC

Nº	Tratamiento	24 Horas	48 Horas	72 horas
T23	<i>B. bassiana</i> + Quinoa	48.68 AB	69.75 AB	96.37 A
T24	<i>B. bassiana</i> + Neem	45.82 AB	63.88 ABCD	91.49 ABC
T25	<i>B. bassiana</i> + Chocho	20.61 CDEFG	40.02 GHI	52.20 FGHI
T26	<i>P. lilacinum</i> 1	9.710 IJKLM	17.41 NOPQ	20.81 MNO
T27	<i>P. lilacinum</i> 2	7.287 KLMN	12.83 Q	17.64 O
T28	<i>T. roseum</i>	4.656 N	17.87 NOPQ	23.63 LMNO
T29	<i>T. virens</i>	13.53 HIJ	23.42 LMNO	28.92 KLM
T30	<i>B. bassiana</i>	41.43 B	50.21 DEFG	63.98 DEF
T31	Canela	9.445 IJKLM	15.89 OPQ	27.27 LMN
T32	Clavo de olor	21.61 CDEF	41.70 FGHI	51.90 FGHI
T33	Quinoa	21.78 CDEF	35.94 HIJ	54.54 FGHI
T34	Neem	25.32 CD	42.74 FGHI	50.00 FGHI
T35	Chocho	8.049 JKLMN	14.90 PQ	24.83 LMNO
T36	Control	0.00 O	0.00 R	0.00 P

Figura 14

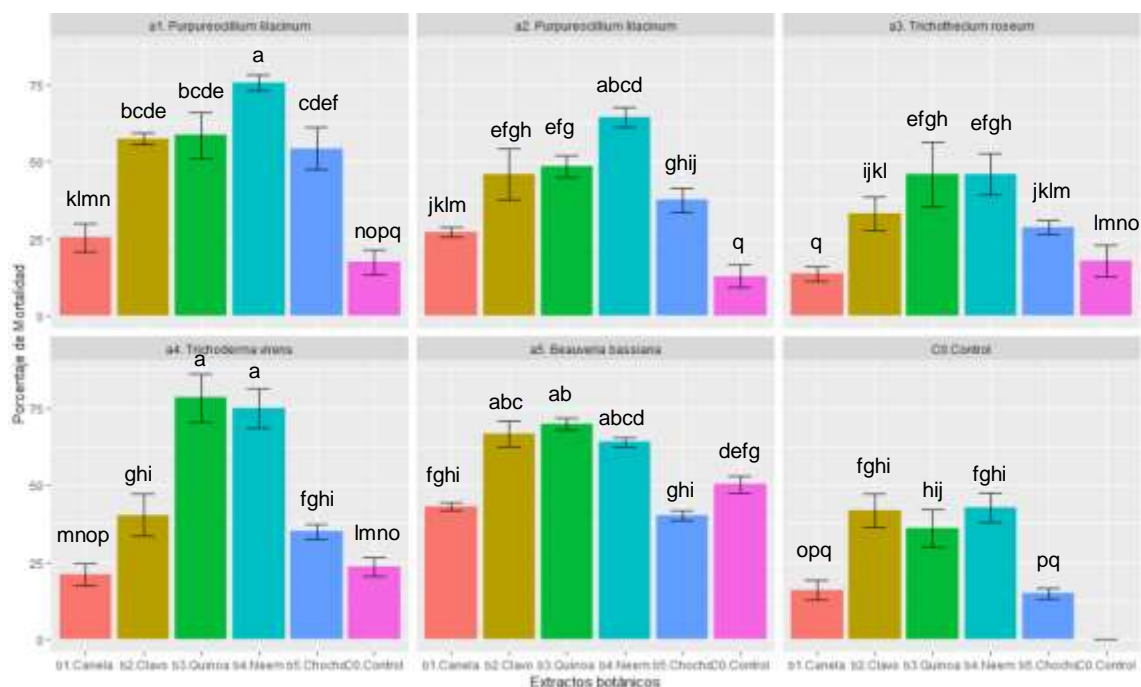
Grupos independientes en la mortalidad de juveniles de *M. incognita* a las 24 h.



Nota. Se puede visualizar que hay mortalidad en los juveniles de *M. incognita* desde las 24 h de ser aplicados los tratamientos, también es evidente que el hongo *B. bassiana* y sus combinación tiene mayor respuesta en este período.

Figura 15

Grupos independientes en la mortalidad de juveniles de M. incognita a las 48 h.

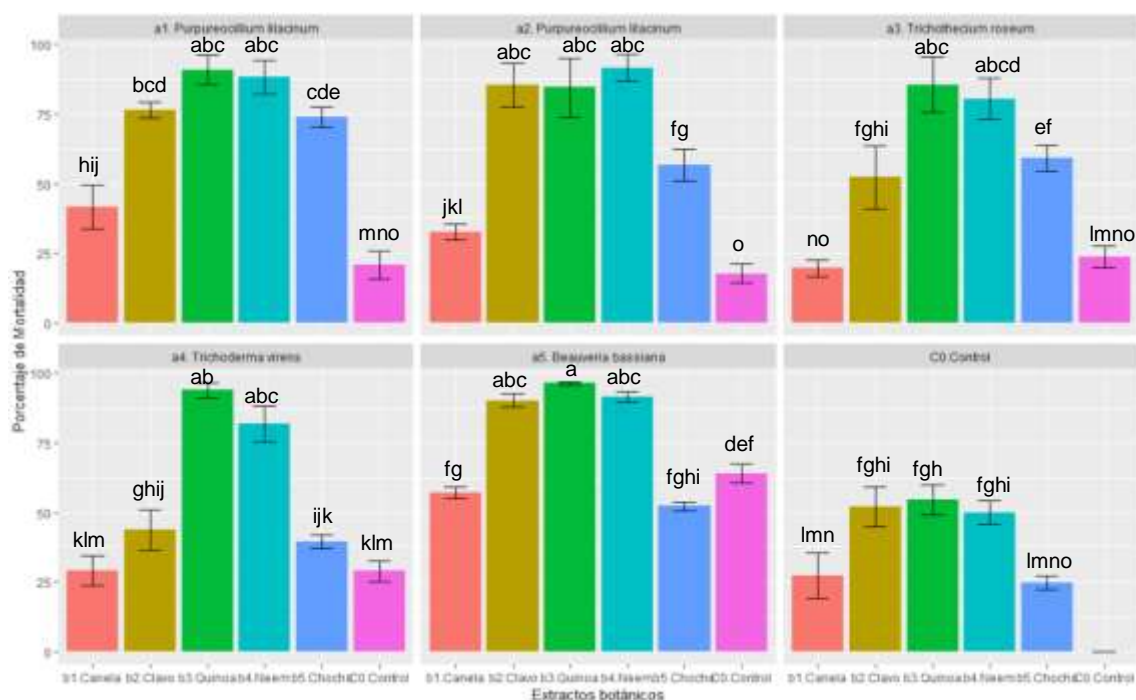


Nota. Se puede visualizar que la actividad nematocida aumenta a las 48 h.

En la figura 16, se visualiza un aspecto interesante porque los resultados de los extractos de quinua, neem y clavo de olor, solos o en combinación con hongos nematofagos presentan valores más altos de mortalidad en comparación del resto de extractos.

Figura 16

Grupos independientes en la mortalidad de juveniles de *M. incognita* a las 72 h.



Nota. Se puede visualizar que a las 72 h de exposición con los tratamientos se logran valores cercanos al 100 de mortalidad, lo que indica la efectividad de ciertos tratamientos para el control de juveniles de *M. incognita* en condiciones de laboratorio.

Youssef et al. (2020) determinó que *P. lilacinum* a una concentración de 1×10^8 causa un 76% de mortalidad sobre juveniles a las 96 horas de exposición, lo que difiere con nuestros resultados donde se obtuvo un porcentaje de 20,81% para el primer aislamiento y 17,74% para el segundo esto puede deberse a la diferencia en concentraciones, debido a que la concentración utilizada fue de $1,5 \times 10^6$, sin embargo, se logró obtener valores mayores al comparado con *P. lilacinum*-extracto de neem (91.61%) y *P. lilacinum*-extracto de quinoa (90.91%) a las 72 horas.

La diferencia en el porcentaje de mortalidad sólo con *P. lilacinum* y en combinación con los extractos de neem y quinoa puede deberse al aporte de ambos

extractos sobre el hongo ya que se conoce que el neem puede actuar como sustrato debido a su contenido en macro y micronutrientes que aportan en la actividad y crecimiento de los hongos (Sharma et al., 2020), pero también, puede deberse a su actividad nematicida demostrada en este estudio donde se obtuvo un 50% de mortalidad en (J2) a las 72 horas de exposición con el extracto, estos resultados son similares con los descritos por (Yasmin et al., 2003) que obtuvo un rango del 40-75% de mortalidad con el mismo periodo de exposición.

De forma similar la quinua tiene componentes como macro y micronutrientes que pueden aportar en el crecimiento de los hongos, es más, se conoce que la quinua es susceptible al crecimiento de hongos (Ahumada et al., 2016), lo que confirma el aporte de esta planta con respecto a los hongos, desde otro enfoque, la quinua también tiene propiedades nematicidas, en este estudio se obtuvo un porcentaje de mortalidad del 54.54% con el extracto de quinua a las 72 horas, aunque no hay estudios previos que determinen el efecto de la quinua en *M. incognita*, la actividad frente a este fitoparásito puede deberse al kaempferol, la miricetina y la quercetina característicos de esta planta (Lin et al., 2019a).

Se conoce que *Purpureocillium lilacinum* coloniza y destruye las hembras, huevos y nemátodos juveniles de *M. incognita*, así mismo, *P. lilacinum* libera metabolitos nematicidas que afectan la viabilidad como leucinostatinas y paeciloxacina, aunque también se han encontrado compuestos como ácido 2-etil butírico, alcohol fenil etílico, ácido benzoico y ácido fenil acético (Sharma et al., 2020).

Youssef et al. (2020) indicó que el porcentaje de mortalidad de *B. bassiana* con concentración de 1×10^6 fue de 78, 80 y 82% a las 24, 48 y 72 horas respectivamente, valores que tienen poca similitud con lo obtenido: 41,43% a las 24 h, 50,21 a las 48 h y

63,98 a las 72 h, no obstante, *B. bassiana* en combinación extractos botánicos superó a los porcentajes reportados, con quinua presentó un valor de 96.37%, con neem 91.49% y con clavo de olor 90.18% a las 72 horas. El efecto nematocida de *B. bassiana* contra *M. incognita* puede deberse a la producción de beauvericina y oosporina que libera este hongo (Youssef et al., 2020).

Al igual que extracto de quinua y neem, el clavo de olor demostró tener actividad nematocida, el valor del porcentaje de mortalidad con este extracto fue de 51.90% a las 72 horas, mientras que, S. L. Meyer et al. (2008) determinó que la concentración media efectiva del aceite esencial de clavo de olor a las 48 h es de 0,145%. Las propiedades nematocidas del clavo de olor se deben al contenido de terpenos y principalmente eugenol (Nasiou & Giannakou, 2020), ya que es el principal compuesto en el aceite de clavo (83–95 %) (Nurdjannah & Bermawie, 2012).

Estudios de *T. virens* como controlador biológico de *M. incognita* indican que el filtrado de *T. virens* para el control de J2 es efectivo a los 14 días de exposición con una mortalidad de 70% (S. L. F. Meyer et al., 2000), mientras que el resultado que se obtuvo a las 72 h fue de 28,92%, aunque, la interacción entre *T. virens* y quinua presentó un valor de 93.86% en el mismo periodo. Meyer et al. (2000), argumentan que la producción de metabolitos es el efecto más relevante en la mortalidad de J2, entre los metabolitos identificados están: catequina, ácido cafeico, ácido ferúlico, gliotoxina y la sepedonina (Moo-Koh et al., 2022).

La actividad nematocida de *T. roseum* se ha reportado en *H. avenae* con un valor de LC50 de 94,9 µg/mL, además, se conoce que *T. roseum* produce compuestos bioactivos como sesquiterpenos que le dan la actividad nematocida (Zhou et al., 2018), por otra parte, el valor obtenido con *T. roseum* a las 72 horas fue de 23.63%, mientras

que en combinación con los extractos de quinoa fueron de 85.51 y 80.48% respectivamente.

Finalmente, los extractos que presentaron valores de mortalidad bajos a las 72 h fueron canela (27.27 %), chocho (24,83%) y sus combinaciones, resultando similar al obtenido por Ibrahim & Hussein (2017) que identificó un valor de 31% en mortalidad con el extracto de canela. Kong et al. (2007) menciona que la actividad nematocida de la canela puede estar relacionada con el contenido de cinamaldehído, en su investigación el (*E*)-cinamaldehído fue el compuesto activo con mayor potencial nematocida, de igual manera el cinamato de etilo, α -metil-(*E*)-cinamaldehído, cinamato de metilo y cinamato de alilo (Ferreira Barros et al., 2021).

Capítulo VII

Conclusiones

Los aislamientos se identificaron molecularmente como *Purpureocillium lilacinum*, *T. virens* y *B. bassiana* pertenecen al grupo de agentes biocontroladores de fitoparásitos. En cambio, el hongo identificado como *T. roseum*, hasta la fecha no se ha reportado como un biocontrolador. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula (H_0) y se concluye que esta especie podría tener actividades biocontroladoras por las toxinas antifúngicas que se han reportado en otras investigaciones.

En las interacciones con los extractos botánicos y diluciones de 1, 5 y 10% se presentaron efectos de inhibición que influyeron en la capacidad de esporulación de los hongos nematófagos en condiciones *in vitro*. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa (H_a) y se concluye que la especie identificada como *T. virens* (a4) fue la menos afectada por la diluciones de los extractos botánicos. Mientras, que las otras especies presentaron un rango de crecimiento normal hasta la dilución del 5 % (c2) en comparación con los controles.

Respecto a la actividad de las interacciones de los hongos nematófagos y extractos botánicos en la eclosión de huevos y mortalidad de juveniles (J2) en *M. incognita*, se demostró que aumentaban el control con el transcurso de las horas. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que los mejores tratamientos que provocan menor eclosión de huevos son los reportados en el grupo independiente S, mientras que los causan la mayor mortalidad de los juveniles (J2), son los encontrados dentro del grupo independiente A.

También concluimos que es suficiente 72 horas de exposición con los

tratamientos evaluados para reducir el porcentaje de eclosión en los huevos de *M. incognita*, del mismo modo, son necesarias 24 horas de exposición para aumentar el porcentaje de mortalidad en juveniles de *M. incognita*.

Capítulo VIII

Recomendaciones

Para la identificación molecular de hongos, se recomienda el procedimiento de extracción de ADN con la metodología descrita por Plaza *et al.* (2004) y la amplificación por PCR con los *primers* universales ITS1 (*forward*) e ITS4 (*reverse*).

Para un mejor establecimiento de compatibilidad entre hongos nematófagos y extractos botánicos se recomienda utilizar los tratamientos de las diluciones desde el 1% hasta el 5%. No obstante, si se pretende inhibir el crecimiento micelial y la esporulación de los hongos, se recomienda aplicar diluciones superiores al 10% de los extractos botánicos.

Respecto a la interacción de extractos botánicos y hongos nemátofagos se recomienda continuar con la investigación en fase invernadero, para obtener un resultado más exacto en el control de *M. incognita* con los tratamientos que presentaron menor porcentaje de eclosión de los huevos a las 120 horas, los cuales fueron las especies de *T. virens*, *B. bassiana*, *P. lilacinum* con los extractos de neem, quinua y clavo de olor.

Y para una mayor la mortalidad de juveniles (J2) de *M. incognita*, se recomienda los tratamientos que presentaron los porcentajes más altos respecto al control a las 72 horas, los cuales fueron las especies de *B. bassiana*, *T. viren*, *P. lilacinum*, *T. roseum* con los extractos de quinoa, neem y clavo de olor.

Capítulo IX

Bibliografía

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J. M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G. J., Deleury, E., Perfus-Barbeoch, L., Anthouard, V., Artiguenave, F., Blok, V. C., Caillaud, M. C., Coutinho, P. M., Dasilva, C., De Luca, F., Deau, F., Esquibet, M., Flutre, T., Goldstone, J. V., Hamamouch, N., ... Wincker, P. (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, 26(8), 909–915. <https://doi.org/10.1038/nbt.1482>
- Abbott, W. S. (1925). The Value of the Dry Substitutes for Liquid Lime. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265–267.
- Acedo-Zegarra, V. J., Arana-Bardales, D. F., & Condo-Montano, A. E. (2020). Actividad antifúngica in vitro de diferentes concentraciones de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” contra *Fusarium oxysporum*. *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, 4(1), 35. <https://doi.org/10.25127/aps.20201.541>
- AGRIOS, G. N. (2005). Control of Plant Diseases. *Plant Pathology*, 293–353. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-047378-9.50015-4>
- Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D., & Benítez, R. (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 45(3), 438–469. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n3.62043>
- Alejo, J. C., Cetz Chi, J. I., Tún Suárez, J. M., Moo Koh, F. A., Peraza Luna, F. A., & Candelero-De la Cruz, J. (Diciembre de 2018). *Filtrados fúngicos de Trichoderma con actividad nematocida contra Meloidogyne incognita (Kofoid & White) Chitwood*. Recuperado el 24 de Julio de 2021, de Revista de Protección Vegetal: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522018000300005
- Alzohairy, M. A. (2016). Therapeutics role of azadirachta indica (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7382506>

- Arias, Y., González, I., Rodríguez, M., Rosales, C., Suárez, Z., & Peteira, B. (2009). General aspects of the interaction tomato (*Solanum lycopersicon* L.) _ *Meloidogyne incognita*. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 1–13.
- Arthurs, S., & Dara, S. K. (2019). Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165(August 2017), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.008>
- Bancoadn. (2020). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. *Departamento de Control de Calidad Del Banco Nacional de ADN*, 1–10. www.bancoadn.org
- Baron, N. C., De Souza Pollo, A., & Rigobelo, E. C. (2020). *Purpureocillium lilacinum* and *Metarhizium marquandii* as plant growth-promoting fungi. *Agricultural and Livestock Microbiology Graduation Program*, 4(4). <https://doi.org/10.7717/peerj.9005>
- Bellafiore, S., Shen, Z., Rosso, M. N., Abad, P., Shih, P., & Briggs, S. P. (2008). Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS Pathogens*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000192>
- Buhrer, E. M., Cooper, C., & Steiner, G. (1933). A list of plants attacked by the root-knot nematode (*Heterodera marioni*). *Plant Disease Reporter*, 17, 64–96.
- Carneiro, R. M. D. G., & Cofcewicz, E. T. (2008). Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee*, 87–122. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8720-2_6
- Chen, W., & Hu, Q. (2022). Secondary metabolites of *Purpureocillium lilacinum*. *Molecules*, 27(1). <https://doi.org/10.3390/molecules27010018>
- Cheng, S. S., Liu, J. Y., Chang, E. H., & Chang, S. T. (2008). Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*, 99(11), 5145–5149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.013>
- Choi, I., Subramanian, P., Shim, D., Oh, B. J., & Hahn, B. S. (2017). RNA-seq of plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* at various stages of its development. *Frontiers in Genetics*, 8(NOV), 7–9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00190>

- Cortés-Avendaño, P., Tarvainen, M., Suomela, J. P., Glorio-Paulet, P., Yang, B., & Repo-Carrasco-Valencia, R. (2020). Profile and Content of Residual Alkaloids in Ten Ecotypes of *Lupinus mutabilis* Sweet after Aqueous Debittering Process. *Plant Foods for Human Nutrition*, *75*(2), 184–191. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00799-y>
- Cruz Fernandez, M., & Sánchez, R. (2004). El árbol del nim, establecimiento y aprovechamiento en la Huasteca Potosina. *Inifap, Primera*(3), 1–33. <http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/Docs-descargar/FOLL.TEC.003.pdf>
- D'Addabbo, T., & Avato, P. (2021). Chemical Composition and Nematicidal Properties of Sixteen Essential Oils—A Review. *Plants*, *10*(7), 1368. <https://doi.org/10.3390/plants10071368>
- De la Cruz, R., Lagunes-Espinoza, L. C., Ortiz-García, C. F., & Pablo-Pérez, M. (2016). ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA in vitro DEL EXTRACTO ACUOSO Y ALCALOIDEO DE *Lupinus* spp. SOBRE *Moniliophthora roreri* In vitro ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE AQUEOUS AND ALKALOID EXTRACT OF *Lupinus* spp. ON *Moniliophthora roreri*. *AGRO Productividad*, *9*, 3–9.
- De Waele, D., & Elsen, A. (2007). Challenges in Tropical Plant Nematology. *Annual Review of Phytopathology*, *45*(1), 457–485. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094438>
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, *88*(2), 308–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- Du, F.-Y., Ju, G.-L., Xiao, L., Zhou, Y.-M., & Wu, X. (2020). Sesquiterpenes and Cyclodepsipeptides from Marine-Derived Fungus *Trichoderma longibrachiatum* and Their Antagonistic Activities against Soil-Borne Pathogens. In *Marine Drugs* (Vol. 18, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/md18030165>
- Dubois, O., Allanic, C., Charvet, C. L., Guégnard, F., Février, H., Théry-Koné, I., Cortet, J., Koch, C., Bouvier, F., Fassier, T., Marcon, D., Magnin-Robert, J. B., Peineau, N., Courtot, E., Huau, C., Meynadier, A., Enguehard-Gueiffier, C., Neveu, C., Boudesocque-Delaye, L., & Sallé, G. (2019). Lupin (*Lupinus* spp.) seeds exert

- anthelmintic activity associated with their alkaloid content. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45654-6>
- El-Saadony, M. T., Abuljadayel, D. A., Shafi, M. E., Albaqami, N. M., Desoky, E.-S. M., El-Tahan, A. M., Mesiha, P. K., Elnahal, A. S. M., Almakas, A., Taha, A. E., Abd El-Mageed, T. A., Hassanin, A. A., Elrys, A. S., & Saad, A. M. (2021). Control of foliar phytoparasitic nematodes through sustainable natural materials: Current progress and challenges. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7314–7326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.035>
- Espinoza, L. F. P., Candelero, J., Cruz, D., María, J., Suárez, T., & Reyes, V. (2015). Control de *Meloidogyne incognita* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con la aplicación de *Trichoderma harzianum*. *Fitosanidad*, 19(1), 5–11.
- Fan, H., Yao, M., Wang, H., Zhao, D., Zhu, X., Wang, Y., Liu, X., Duan, Y., & Chen, L. (2020). Isolation and effect of *Trichoderma citrinoviride* Sneh1910 for the biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *BMC Microbiology*, 20(1), 299. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01984-4>
- Ferreira Barros, A., Paulo Campos, V., Lopes de Paula, L., Alaís Pedroso, L., de Jesus Silva, F., Carlos Pereira da Silva, J., Ferreira de Oliveira, D., & Humberto Silva, G. (2021). The role of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil, (E)-cinnamaldehyde and (E)-cinnamaldehyde oxime in the control of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Phytopathology*, 169(4), 229–238. <https://doi.org/10.1111/jph.12979>
- Fleming, T. R., McGowan, N. E., Maule, A. G., & Fleming, C. C. (2016). Prevalence and diversity of plant parasitic nematodes in Northern Ireland grassland and cereals, and the influence of soils and rainfall. *Plant Pathology*, 65(9), 1539–1550. <https://doi.org/10.1111/ppa.12525>
- Fong Lores, O., Berenguer Rivas, C., de la Vega Acosta, J., Wawoe Díaz, N., & Puente Zapata, E. (2014). Potencial antioxidante de un extracto acuoso de hojas del NIM (*Azadirachta Indica* A. Juss) TT - Antioxidant potential of an aqueous leaf extract of Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss). *Rev. Cuba. Plantas Med*, 19(2), 205–207. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962014000200009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962014000200009&lng=es.%0Ahttp://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962014000200009)

- Gao, J., Mamouni, K., Zhang, L., & Lokeshwar, B. L. (2021). 13 - *Spice up your food for cancer prevention: Cancer chemo-prevention by natural compounds from common dietary spices* (A. K. Srivastava, V. K. Kannaujiya, R. K. Singh, & D. B. T.-E. D. as a S. for A. M. Singh (eds.); pp. 275–308). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821710-8.00013-8>
- Gebremariam, A., Chekol, Y., & Assefa, F. (2021). Phenotypic, molecular, and virulence characterization of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin, and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin from soil samples of Ethiopia for the development of mycoinsecticide. *Heliyon*, 7(5), e07091.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07091>
- Gheysen, G., & Mitchum, M. G. (2019). Phytoparasitic nematode control of plant hormone pathways. *Plant Physiology*, 179(4), 1212–1226.
<https://doi.org/10.1104/pp.18.01067>
- Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R., & Kariman, K. (2018). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, 117, 147–157.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.11.006>
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. *Servicio Nacional de Sanidad Agrícola (SENASA)*, 37.
<https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producción-y-Uso-de-Hongos-Entomopatógenos.pdf>
- Grewal, P. S., & Grewal, S. K. (1988). Selective fungicidal properties of some plant extracts to mushroom weed moulds / Proprietà fungicide selettive di alcuni estratti di piante a muffe. *Phytopathologia Mediterranea*, 27(2), 112–114.
<http://www.jstor.org/stable/42684907>
- Guerrero, R. (2017). Manual de nematodos fitoparásitos identificados de especies cuarentanarias. *Agrocalidad. Ecuador: Quito*, 136(1), 1–42.
- Gulisano, A., Alves, S., Martins, J. N., & Trindade, L. M. (2019). Genetics and Breeding of *Lupinus mutabilis*: An Emerging Protein Crop. *Frontiers in Plant Science*, 10(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01385>

- Habana, L., Arrieta, J., & Galicia, A. (2009). "Un estudio de la constitución y deconstrucción de prácticas de los ingenieros bioquímicos, el caso de las diluciones seriadas." *Univerdiad Autónoma de Guerrero*.
- Hama, J. R., & Strobel, B. W. (2020). Natural alkaloids from narrow-leaf and yellow lupins transfer to soil and soil solution in agricultural fields. *Environmental Sciences Europe*, 32(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00405-7>
- Hamid, M. I., Hussain, M., Ghazanfar, M. U., Raza, M., & Liu, X. Z. (2014). *Trichothecium roseum* causes fruit rot of tomato, orange, and apple in Pakistan. *Plant Disease*, 98(9), 1271. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-14-0051-PDN>
- Hernández-Ledesma, B. (2019). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as source of bioactive compounds: a review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 2, 27. <https://doi.org/10.31989/bchd.v2i3.556>
- Hoddle, M. S., & Van Driesche, R. G. (2009). Biological Control of Insect Pests. In *Encyclopedia of Insects* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00033-3>
- Huang, F., Kong, J., Ju, J., Zhang, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Xie, Y., & Yao, W. (2019). Membrane damage mechanism contributes to inhibition of trans-cinnamaldehyde on *Penicillium italicum* using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36989-7>
- Hussey, R., & Baker, K. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57(12), 1025–1028. <https://eurekamag.com/research/000/002/000002412.php>
- Ibrahim, D., & Hussein, R. (2017). Phytochemical Screening and Nematicidal Activity of Cinnamon and Ginger Extracts Against Root-knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) Infecting Tomato. *Egyptian Journal of Agronematology*, 16(2), 63–84. <https://doi.org/10.21608/ejaj.2017.56137>
- Imoulan, A., Hussain, M., Kirk, P. M., El Meziane, A., & Yao, Y.-J. (2017). Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of*

Asia-Pacific Entomology, 20(4), 1204–1212.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.08.015>

INIAP. (2021). *Departamento de Nutrición y Calidad*. Obtenido de Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-Estación experimental Santa Catalina: <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/estaciones/meecat/mdepeecat>

Isaac, G. S., El-Deriny, M. M., & Taha, R. G. (2021). Efficacy of *Purpureocillium lilacinum* AUMC 10149 as biocontrol agent against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infecting tomato plant. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 84, e253451. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.253451>

Isaura Cáceres, R. de L., Rafael, C. V., Erika, S. M., Laila N., M. C., & León, H. O. (2013). Actividad Antifúngica in vitro de Extractos Acuáticos de Especies Antifungal Activity in vitro of the Aqueous Extracts of Spice ' s Against. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31, 105–112.

Islas, J. F., Acosta, E., G-Buentello, Z., Delgado-Gallegos, J. L., Moreno-Treviño, M. G., Escalante, B., & Moreno-Cuevas, J. E. (2020). An overview of Neem (*Azadirachta indica*) and its potential impact on health. *Journal of Functional Foods*, 74(April), 104171. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104171>

Jagessar, R. (2020). Plant Extracts as Biological Control Agents. *Open Access Journal of Biogeneric Science and Research*, 5(3), 1–6. <https://doi.org/10.46718/jbgsr.2020.05.000123>

Jones, M. G. K., & Goto, D. B. (2011). Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3>

Karunamoorthi, K., Mohammed, M., & Wassie, F. (2012). Knowledge and practices of farmers with reference to pesticide management: Implications on human health. *Archives of Environmental and Occupational Health*, 67(2), 109–116. <https://doi.org/10.1080/19338244.2011.598891>

Kaspary, T. E., de Souza, I. T., Ramos, R. F., & Bellé, C. (2021). Host status of morning-glory (*Ipomoea* spp.) to *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 53, 1–6. <https://doi.org/10.21307/JOFNEM-2021-018>

- Khan, R. A., Najeeb, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y., & Xie, B. (2020). Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Bacteria and Root-Knot Nematode. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 3).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8030401>
- Kiewnick, S., Neumann, S., Sikora, R. a., & Frey, J. E. (2006). Importance of nematode inoculum density and antagonist dose for biocontrol efficacy of *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Phytopathology*, *96*(1), S60–S60.
- Kiontke, K., & Fitch, D. H. A. (2013). Nematodes. *Current Biology*, *23*(19), 862–864.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.009>
- Kong, J. O., Lee, S. M., Moon, Y. S., Lee, S. G., & Ahn, Y. J. (2007). Nematicidal activity of cassia and cinnamon oil compounds and related compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *Journal of Nematology*, *39*(1), 31–36.
- Kumar, V., Marković, T., Emerald, M., & Dey, A. (2015). Herbs: Composition and Dietary Importance. *Encyclopedia of Food and Health*, 332–337.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00376-7>
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Alcalde, M., & Ballesteros, A. (2014). *Trichoderma* Enzymes for Food Industries. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00024-2>
- Liang, Y.-J., Ariyawansa, H. A., Becker, J. O., & Yang, J.-I. (2020). The Evaluation of Egg-Parasitic Fungi *Paraboeremia taiwanensis* and *Samsoniella* sp. for the Biological Control of *Meloidogyne enterolobii* on Chinese Cabbage. *Microorganisms*, *8*(6), 828. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060828>
- Lin, M., Han, P., Li, Y., Wang, W., Lai, D., & Zhou, L. (2019a). Quinoa secondary metabolites and their biological activities or functions. *Molecules*, *24*(13).
<https://doi.org/10.3390/molecules24132512>
- Lin, M., Han, P., Li, Y., Wang, W., Lai, D., & Zhou, L. (2019b). Quinoa Secondary Metabolites and Their Biological Activities or Functions. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 13). <https://doi.org/10.3390/molecules24132512>

- López-Pantoja, Y., Angulo-Escalante, M., Martínez-Rodríguez, C., Soto-Brilrán, J., & Chaidez-Quiroz, C. (2007). Artemisa (*Azadirachta indica* A . Juss) y venadillo (*Swietenia humilis*. *Bioquimia*, 32(4), 117–125.
<http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2007/bq074b.pdf>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02322.x>
- Madden, T. L., Tatusov, R. L., & Zhang, J. (1996). Applications of network BLAST server. *Methods in Enzymology*, 266, 131–141. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)66011-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)66011-x)
- Mahmoud, D. A., Hassanein, N. M., Youssef, K. A., & Abou Zeid, M. A. (2011). Das Bau-SOLL im Tunnelbau Wo liegen die Missverständnisse Wo liegen die größten Irrtümer. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 42(3), 1007–1016.
- Manzanilla-López, R., & Starr, J. (2009). Interactions with other pathogens. En R. Perry, M. Moens, & J. L. Start, *Root-knot nematodes* (pág. 223). Wallingford, Oxfordshire: CAB International.
- Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30(5), 11–22.
- Masaquiza Chango, C. E. (2019). Caracterización morfológica y molecular de hongos asociados a la rizósfera de plantas de café en la isla Santa Cruz–Galápagos. *Universidad Central Del Ecuador*, 105.
<https://repositorio.uce.edu.ec/archivos/neyazan/CodigoEtica/CodigoEtica2019.pdf>
- Mazumder, T., Mamun, I. P., Zaman, M. S., Islam, A. K. M. K., Chowdhury, S., Reza, M. S., & Hussain, M. S. (2021). Comparative lipid and uric acid suppressing properties of four common herbs in high fat-induced obese mice with their total phenolic and flavonoid index. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 100990.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100990>
- Mbaveng, A. T., & Kuete, V. (2017). *Syzygium aromaticum*. In *Medicinal Spices and*

Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00029-7>

- Mendes, C. A. C., Mendes, G. E., Cipullo, J. P., & Burdmann, E. A. (2005). Acute intoxication due to ingestion of vegetables contaminated with aldicarb. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 43(2), 117–118.
- Meyer, S. L. F., Massoud, S. I., Chitwood, D. J., & Roberts, D. P. (2000). Evaluation of *Trichoderma virens* and *Burkholderia cepacia* for antagonistic activity against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, 2(8), 871–879. <https://doi.org/https://doi.org/10.1163/156854100750112815>
- Meyer, S. L., Lakshman, D. K., Zasada, I. A., Vinyard, B. T., & Chitwood, D. J. (2008). Dose–response effects of clove oil from *Syzygium aromaticum* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Pest Management Science*, 63(11), 1100–1106. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Moens, M., Perry, R. N., & Starr, J. L. (2009a). *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. *Root-Knot Nematodes, September*, 1–17. <https://doi.org/10.1079/9781845934927.0001>
- Moens, M., Perry, R. N., & Starr, J. L. (2009b). *Meloidogyne* species: a diverse group of novel and important plant parasites. 1–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1079/9781845934927.0001>
- Molinari, S., & Leonetti, P. (2019). Bio-control agents activate plant immune response and prime susceptible tomato against root-knot nematodes. *PLoS ONE*, 14(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213230>
- Moo-Koh, F. A., Cristóbal-Alejo, J., Andrés, M. F., Martín, J., Reyes, F., Tun-Suárez, J. M., & Gamboa-Angulo, M. (2022). In Vitro Assessment of Organic and Residual Fractions of Nematicidal Culture Filtrates from Thirteen Tropical *Trichoderma* Strains and Metabolic Profiles of Most-Active. *Journal of Fungi*, 8(1), 82. <https://doi.org/10.3390/jof8010082>
- Morillo, E., & Miño, G. (2011). Marcadores moleculares en biotecnología agrícola: Manual de técnicas y procedimientos en INIAP. *Instituto Nacional Autónomo de*

Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina.

- Mostrom, M. (2015). Mycotoxins: Classification. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00478-5>
- Muimba-Kankolongo, A. (2018a). *Chapter 11 - Vegetable Production* (A. B. T.-F. C. P. by S. F. in S. A. Muimba-Kankolongo (ed.); pp. 205–274). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814383-4.00011-6>
- Muimba-Kankolongo, A. (2018b). *Chapter 4 - Crops Diseases and Pests* (A. B. T.-F. C. P. by S. F. in S. A. Muimba-Kankolongo (ed.); pp. 23–39). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814383-4.00004-9>
- Muñoz Castellanos, L., Amaya Olivas, N., Ayala-Soto, J., De La O Contreras, C. M., Zermeño Ortega, M., Sandoval Salas, F., & Hernández-Ochoa, L. (2020). In Vitro and in Vivo Antifungal Activity of Clove (*Eugenia caryophyllata*) and Pepper (*Piper nigrum* L.) Essential Oils and Functional Extracts against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1702037>
- Nair, K. P. P. (2013). The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger. In K. P. P. B. T.-T. A. and E. of T. and G. Nair (Ed.), *Diseases of Turmeric* (pp. 139–157). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394801-4.00010-7>
- Nasiou, E., & Giannakou, I. O. (2020). The potential of eugenol as a nematocidal agent against *Meloidogyne javanica* (Treb.) Chitwood. *Journal of Nematology*, 52, 1–10. <https://doi.org/10.21307/JOFNEM-2020-103>
- Nordbring-Hertz, B., Jansson, H., & Tunlid, A. (2006). Nematophagous Fungi. *ELS*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0004293>
- Oliveira, I., Pereira, J. A., Bento, A., & Baptista, P. (2011). Viability of *Beauveria bassiana* isolates after storage under several preservation methods. *Annals of Microbiology*, 61(2), 339–344. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0147-8>
- OuYang, Q., Duan, X., Li, L., & Tao, N. (2019). Cinnamaldehyde exerts its antifungal activity by disrupting the cell wall integrity of *Geotrichum citri-aurantii*. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00055>

- Ozkan, B. M., & Ahmet, A. (2016). Isolation, identification and molecular characterization of cellulolytic bacteria from rumen samples collected from Erzurum slaughter house, Turkey. *Research Journal of Biotechnology*, 11(2), 32–38.
- Pereira, E., Cadavez, V., Barros, L., Encina-Zelada, C., Stojković, D., Sokovic, M., Calhelha, R. C., Gonzales-Barron, U., & Ferreira, I. C. F. R. (2020). Chenopodium quinoa Willd. (quinoa) grains: A good source of phenolic compounds. *Food Research International*, 137(May), 109574.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109574>
- Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58(11), 1454–1462.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.010538-0>
- Płaza, G. A., Upchurch, R., Brigmon, R. L., Whitman, W. B., & Ulfig, K. (2004). Rapid DNA extraction for screening soil filamentous fungi using PCR amplification. *Polish Journal of Environmental Studies*, 13(3), 315–318.
- Poveda, J., Abril-Urias, P., & Escobar, C. (2020). Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance: Trichoderma, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. *Frontiers in Microbiology*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00992>
- Prado, R. M. (2018). Evaluación de técnicas de extracción de saponinas de la quinua (*Chenopodium quinoa willd*) como alternativa de mejoramiento para la cadena productiva en Cundinamarca. *UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA UNAD*, 2(January), 6. <http://ieeauthorcenter.ieee.org/wp-content/uploads/IEEE-Reference-Guide.pdf>
<http://www.lib.murdoch.edu.au/find/citation/ieee.html>
<https://doi.org/10.1016/j.cie.2019.07.022>
<https://github.com/ethereum/wiki/wiki/White-Paper>
<https://tore.tuhh.de/hand>
- Prasad, P., Varshney, D., & Adholeya, A. (2015). Whole genome annotation and comparative genomic analyses of bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum*. *BMC Genomics*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2229-2>

- Pulavarty, A., Egan, A., Karpinska, A., Horgan, K., & Kakouli-Duarte, T. (2021). Plant Parasitic Nematodes: A Review on Their Behaviour, Host Interaction, Management Approaches and Their Occurrence in Two Sites in the Republic of Ireland. In *Plants* (Vol. 10, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/plants10112352>
- Racines-Oliva, M., Tamayo-Gutiérrez, E. A., Jarrín, M., Báez, F., & Tello, C. (2019). Alternativas de control orgánico in vitro para *Dactylonectria torresensis* en la mora de castilla (*Rubus glaucus*) en Ecuador. *Enfoque UTE*, 10(4), 67–77. <https://doi.org/10.29019/enfoque.v10n4.525>
- Raya-pérez, M., Sánche-Arizpe, A., García-Martínez, O., Galindo-Cepeda, M. E., Rodríguez-Guerra, R., & Peña-Carrillo, K. I. (2018). *Isolation , characterization and pathogenicity of fungi causing descending death of American Black Walnut*. 9(5), 1061–1066.
- Rifai, M. A., & Cooke, R. C. (1966). Studies on some didymosporous genera of nematode-trapping hyphomycetes. *Transactions of the British Mycological Society*, 49(1), 147–168. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(66\)80045-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0007-1536(66)80045-1)
- Robertson, L., Díez-Rojo, M. A., López-Pérez, J. A., Buena, A. P., Escuer, M., Cepero, J. L., Martínez, C., & Bello, A. (2009). New host races of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica* from horticultural regions of Spain. *Plant Disease*, 93(2), 180–184. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-2-0180>
- Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100(8), 923–935. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80043-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80043-8)
- Senthilkumar, M., Anandham, R., & Krishnamoorthy, R. (2020). *Paecilomyces*. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 793–808. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00041-1>
- Šernaitė, L., Rasiukevičiūtė, N., & Valiuškaitė, A. (2020). The extracts of cinnamon and clove as potential biofungicides against strawberry grey mould. *Plants*, 9(5), 15–20. <https://doi.org/10.3390/plants9050613>
- Shahidi, F., & Hossain, A. (2018). Bioactives in spices, and spice oleoresins: Phytochemicals and their beneficial effects in food preservation and health

- promotion. *Journal of Food Bioactives*, 3, 8–75.
<https://doi.org/10.31665/jfb.2018.3149>
- Sharma, A., Gautam, S., & Mishra, B. B. (2014). Trichothecium. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 3, 647–652. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00338-4>
- Shi, Q., Mao, Z., Zhang, X., Ling, J., Lin, R., Zhang, X., Liu, R., Wang, Y., Yang, Y., Cheng, X., & Xie, B. (2018). The novel secreted Meloidogyne incognita effector MiISE6 targets the host nucleus and facilitates parasitism in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 9(March), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00252>
- Shoff, C. J., & Perfect, J. R. (2021). Uncommon yeasts and molds causing human disease. In *Encyclopedia of Mycology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21023-6>
- Siddiqui, Z. A., & Mahmood, I. (1996). Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A review. *Bioresource Technology*, 58(3), 229–239.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00122-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00122-8)
- Silva, P. M., Massuela, D. C., Khan, M. W., Hamar, A., Khajehei, F., Grae, S., & Piatti, C. (2020). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): An Overview of the Potentials of the “Golden Grain” and Socio-Economic and Environmental Aspects of Its Cultivation and Marketization. *Foods*, 9(216), 31.
- Singh, Satyandra, Singh, B., & Singh, A. P. (2015). Nematodes: A Threat to Sustainability of Agriculture. *Procedia Environmental Sciences*, 29, 215–216.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.270>
- Singh, Saytandra, Pandey, R. K., & Goswami, B. K. (2013). Bio-control activity of *Purpureocillium lilacinum* strains in managing root-knot disease of tomato caused by *Meloidogyne incognita*. *Biocontrol Science and Technology*, 23(12), 1469–1489.
<https://doi.org/10.1080/09583157.2013.840770>
- Sinha, K. K., Choudhary, A. K., & Kumari, P. (2016). Entomopathogenic Fungi. In *Ecofriendly Pest Management for Food Security*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00015-4>

- Siripatrawan, U. (2016). Active food packaging from chitosan incorporated with plant polyphenols. In *Novel Approaches of Nanotechnology in Food*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804308-0.00014-5>
- Soares, F. E. de F., Sufiate, B. L., & de Queiroz, J. H. (2018). Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. *Agriculture and Natural Resources*, *52*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.05.010>
- Soumare, A., Diédhiou, A. G., Arora, N. K., Tawfeeq Al-Ani, L. K., Ngom, M., Fall, S., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Kouisni, L., & Sy, M. O. (2021). Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture. *Frontiers in Microbiology*, *12*(March). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649878>
- Stuardo, M., & San Martín, R. (2008). Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*, *27*(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.11.003>
- Sun, X., Yang, X., Xue, P., Zhang, Z., & Ren, G. (2019). Improved antibacterial effects of alkali-transformed saponin from quinoa husks against halitosis-related bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *19*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2455-2>
- Tartanus, M., Furmanczyk, E. M., Canfora, L., Pinzari, F., Tkaczuk, C., Majchrowska-Safaryan, A., & Malusá, E. (2021). Biocontrol of melolontha spp. Grubs in organic strawberry plantations by entomopathogenic fungi as affected by environmental and metabolic factors and the interaction with soil microbial biodiversity. *Insects*, *12*(2), 1–23. <https://doi.org/10.3390/insects12020127>
- Tran, H. N. H., Graham, L., & Adukwu, E. C. (2020). In vitro antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* bark and leaf essential oils against *Candida albicans* and *Candida auris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(20), 8911–8924. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10829-z>
- Velázquez-Mendoza, J., Salgado-Feregrino, O. J., Yáñez-Morales, M. de J., & Jiménez-Casas, M. (2017). In vitro primer reporte del efecto de nutrimentos y del silicio en el crecimiento de *Phaeocryptopus gaeumannii*, un patógeno de *Pseudotsuga menziesii*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*,

35(1), 139–149. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1609-2>

- Venmathi Maran, B. A., Josmeh, D., Tan, J. K., Yong, Y. S., & Shah, M. D. (2021). Efficacy of the Aqueous Extract of *Azadirachta indica* Against the Marine Parasitic Leech and Its Phytochemical Profiling. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/molecules26071908>
- Vincent, J. M. (1947). Distortion of fungal hyphæ in the presence of certain inhibitors. *Nature*, 159(4051), 850. <https://doi.org/10.1038/159850b0>
- Wang, X., Xue, B., Dai, J., Qin, X., Liu, L., Chi, Y., Jones, J. T., & Li, H. (2018). A novel *Meloidogyne incognita* chorismate mutase effector suppresses plant immunity by manipulating the salicylic acid pathway and functions mainly during the early stages of nematode parasitism. *Plant Pathology*, 67(6), 1436–1448. <https://doi.org/10.1111/ppa.12841>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). 38 - AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. B. T.-P. C. R. P. White (eds.); pp. 315–322). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Woldemichael, G. M., & Wink, M. (2001). Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2327–2332. <https://doi.org/10.1021/jf0013499>
- Wu, Q., Sun, R., Ni, M., Yu, J., Li, Y., Yu, C., Dou, K., Ren, J., & Chen, J. (2017). Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. *PloS One*, 12(6), e0179957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179957>
- Yasmin, L., Rashid, M. H., Uddin, M. N., Hossain, M. S., Hossain, M. E., & Ahmed, M. U. (2003). Use of Neem Extract in Controlling Root-knot Nematode (*Meloidogyne javanica*) of Sweet-gourd (pp. 161–168). *Plant Pathology Journal*. <https://doi.org/10.3923/ppj.2003.161.168>
- Yergaliyev, T., Alexander-Shani, R., Dimeretz, H., Pivonia, S., Bird, D. M. K., Rachmilevitch, S., & Szitenberg, A. (2020). The bacterial community structure

dynamics in meloidogyne incognita infected roots and its role in worm-microbiome interactions. *BioRxiv, March*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.25.007294>

Youssef, M. M. A., El-Nagdi, W. M. A., & Lotfy, D. E. M. (2020). Evaluation of the fungal activity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* as biocontrol agents against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on cowpea. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1).
<https://doi.org/10.1186/s42269-020-00367-z>

Zamora, F., García, P., Ruiz, M., & Salcedo, E. (2008). COMPOSITION OF ALKALOIDS IN SEEDS OF *Lupinus mexicanus* (FABACEAE) AND ANTIFUNGAL AND ALLELOPATHIC EVALUATION OF THE ALKALOID EXTRACT. *Agrociencia*, 42(2), 185–192.

Zhang, W., Cheng, X., Liu, X., & Xiang, M. (2016). Genome Studies on Nematophagous and Entomogenous Fungi in China. In *Journal of Fungi* (Vol. 2, Issue 1).
<https://doi.org/10.3390/jof2010009>

Zhang, X., Li, G., Ma, J., Zeng, Y., Ma, W., & Zhao, P. (2010). Endophytic fungus *Trichothecium roseum* LZ93 antagonizing pathogenic fungi in vitro and its secondary metabolites. *The Journal of Microbiology*, 48(6), 784–790.
<https://doi.org/10.1007/s12275-010-0173-z>

Zhou, Y. M., Ju, G. L., Xiao, L., Zhang, X. F., & Du, F. Y. (2018). Cyclodepsipeptides and sesquiterpenes from marine-derived fungus *trichothecium roseum* and their biological functions. *Marine Drugs*, 16(12). <https://doi.org/10.3390/md16120519>