



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Trabajo Final de la carrera de Ingeniería Agronómica

“Asociaciones de bacterias y hongos benéficos como estrategia de control de *Nacobbus aberrans* en el Cinturón Hortícola de La Plata.”

Trabajo Final conjunto de las Alumnas:

Alumnas: Molar Martina

Sacks Tatiana Carmen

Legajo: 27129/2

27508/0

DNI: 37.369.616

37.139.667

E-mail: martinamolar@hotmail.com

tatianacsacks@gmail.com

Teléfono: 2241-566226

221-6053256

Directora: Dra. Marcela F. Ruscitti

Codirectora: Ing. Agr. Valeria Bernardo

26 de Febrero del 2021, La Plata

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
Cultivo de pimiento.....	6
Importancia mundial y nacional.....	7
Morfología y ecofisiología.....	7
Suspensión de bromuro de metilo	9
<i>Nacobbus aberrans</i>	11
Microorganismos beneficios para el control de <i>N. aberrans</i>	14
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	14
<i>Bacillus thuringiensis</i>	17
<i>Rhizophagus intraradices</i>	18
HIPOTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
ACTIVIDADES Y METODOLOGIA	22
Parámetros determinados.....	27
RESULTADOS Y DISCUSION	34
CONCLUSIONES	60
CONSIDERACIONES FINALES.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63

RESUMEN

El “nematodo del rosario”, *Nacobbus aberrans*, causa importantes pérdidas económicas en el Cinturón Hortícola Platense. En las raíces de las plantas afectadas por este fitopatógeno endoparásito, se observa la presencia de agallas que limitan el transporte de agua y nutrientes, disminuyendo el crecimiento, el rendimiento e incluso provocando la muerte de las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). El método más difundido por años entre los productores hortícolas para su control fue mediante el uso, en ocasiones indiscriminado, de bromuro de metilo (fumigante/desinfectante químico). A pesar de que su efecto sobre los nematodos es muy eficiente se ha comprobado que daña la capa de ozono, razón por la cual ha sido prohibida su utilización en Argentina. Por este motivo han surgido diferentes líneas de investigación para encontrar nuevas alternativas para el manejo del nematodo de rosario. Una de las prácticas más estudiadas es el control biológico, es decir, la aplicación de distintos microorganismos como hongos nematófagos, hongos micorrícicos arbusculares y bacterias entomopatógenas. Muy pocos estudios se han enfocado en el empleo de éstos en forma conjunta.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto de la inoculación conjunta de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* Berliner, el hongo nematófago *Paecilomyces lilacinus* y el hongo formador de micorrizas arbusculares *Rhizophagus intraradices* en un suelo infestado con *Nacobbus aberrans* sobre la población del mismo y el crecimiento de plantas de pimiento.

Para tal fin, este trabajo experimental se realizó en condiciones semicontroladas de temperatura en invernáculo. Los tratamientos aplicados fueron: inoculación solitaria de los agentes de control biológico (ACB), todas las combinaciones posibles entre ellos y un testigo (sin inoculación de ACB). Esto se realizó bajo dos condiciones de infestación con nematodos: plantas no inoculadas e inoculadas con *N. aberrans*.

En plantas de pimiento se midieron parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Se determinaron también variables relacionadas con la respuesta de los ACB en presencia y ausencia del nematodo. Los datos se analizaron mediante ANOVA.

El crecimiento de las plantas y los parámetros fisiológicos determinados, como la conductancia estomática, la fotosíntesis neta, el rendimiento cuántico del fotosistema II, la conductividad relativa de las membranas celulares y el contenido de proteínas solubles mostraron evidencias de daño ocasionado por *N. aberrans*. Lo que se condice con plantas sometidas a estrés hídrico y nutricional. Las plantas inoculadas con los microorganismos benéficos en presencia del nematodo morigeraron esos daños y por ende el estrés producido.

En cuanto al porcentaje de micorrización, no fue afectado por la presencia de nematodos, al igual que por los otros microorganismos benéficos, en los tratamientos combinados. El número de huevos totales del nematodo disminuyó significativamente en todos los tratamientos inoculados tanto individualmente como combinados por los microorganismos benéficos, comparado con el tratamiento control, sin inoculación. Todo esto sugiere que el uso de microorganismos benéficos reduce la infestación por *N. aberrans* y mejora el crecimiento de las plantas; siendo eficiente su aplicación como agentes de control biológico contra nematodos y a su vez como biofertilizante.

INTRODUCCIÓN

En nuestro país, se cultivan anualmente 700.000 ha de hortalizas, de las cuales el 90 % es destinado al mercado en fresco. Las principales hortalizas cultivadas en Argentina son: poroto, papa, garbanzo, cebolla, lechuga, tomate, arveja, lenteja, zapallo, maíz dulce, pimiento, entre otros (CFI, 2016). La distribución de la superficie ocupada por las mismas se puede observar en la figura 1.

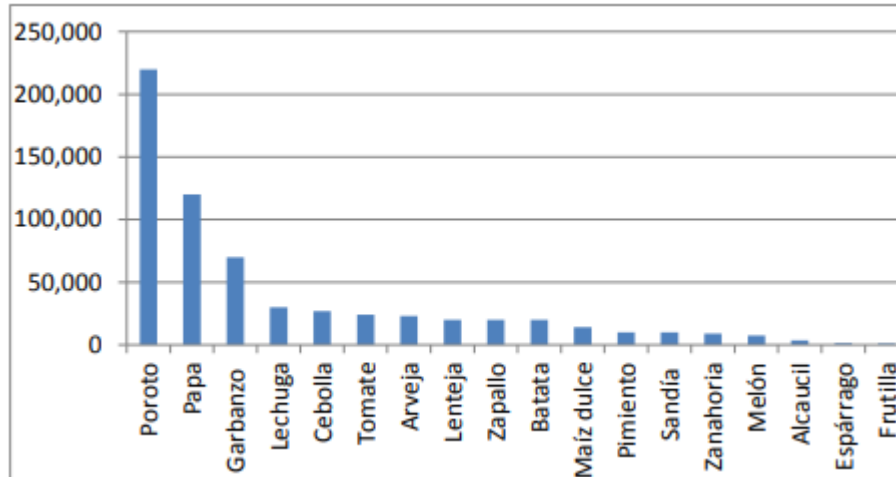


Figura 1: Distribución de superficie (ha) cultivada con hortalizas en Argentina (Fuente CFI, 2016).

La producción de hortalizas se extiende a lo largo de todo el país debido a la diversidad del clima. La mayor producción de hortalizas para consumo fresco se localiza en las cercanías a los grandes centros urbanos, en los denominados “Cinturones Verdes” (CFI, 2016). Buenos Aires, cuenta con la mayor proporción relativa: 20% de superficie total implantada con hortalizas en Argentina y 22% de la producción total del país (Fernández Lozano, 2012).

El Cinturón Hortícola Platense (CHP) (figura 2) se caracteriza por la producción altamente intensiva de cultivos hortícolas, con una alta dependencia del uso de productos fitosanitarios y fertilizantes, con la consiguiente degradación de los suelos y la contaminación de las aguas, lo que ha generado diversos problemas socio ambientales (Souza Casadinho & Bocero, 2008).



Figura 2: Ubicación del Cinturón Hortícola de La Plata, Provincia de Buenos Aires (Argentina). Fuente: El Peligro de los agrotóxicos: entre el Trabajo y la Salud. Trabajo final- Medicina Social 2016 (Alonso *et al.*, 2016).

El último Censo Horti-Florícola de Buenos Aires (CHFBA, 2005) estimó una producción anual promedio de 75.000 tn de hortalizas. La totalidad de la producción tiene como destino el consumo en fresco, abasteciendo al área metropolitana comprendida por más de 13 millones de habitantes. La lechuga es el cultivo que ocupa la mayor superficie cultivada, seguido por el tomate, pimiento, alcaucil, acelga y espinaca. La variedad de hortalizas cultivadas es muy amplia, superando las 30 especies diferentes, incluyendo apio, berenjena, choclo, chaucha, remolacha, zapallito, zapallo, sandía, cebolla, brócoli, hinojo, alcaucil y otras verduras de hoja (Garat *et al.* 2009).

Cultivo de Pimiento

El pimiento es un cultivo originario de América del sur, de la zona de Perú y Bolivia y, desde allí se expandió hasta América central y Meridional. Sus frutos son consumidos crudos o cocidos y, a nivel industrial, se emplean para la producción de

productos de II Gama (conservas en vinagre y polvo para condimento) y de III Gama (congelados). Desde el punto de vista varietal, el pimiento presenta una amplia gama de genotipos utilizados para encurtidos, obtención de pimentón y consumo fresco; de estos últimos, los genotipos de pimiento dulce suelen tener frutos de tamaño grande y se cultivan en invernaderos. Son los más sensibles a situaciones de cultivo limitantes (Butcher *et al.* 2013).

Importancia mundial y nacional

Argentina es el principal productor de pimiento en Sudamérica, ocupando una superficie que varía año a año de 3.000 a 6.000 ha (Del Pino, 2020) de las cuales 1.700 ha corresponden a la producción bajo cubierta. Su cultivo se extiende desde la provincia de Jujuy hasta Río Negro, siendo las principales provincias productoras para consumo en fresco, tanto al aire libre como en invernadero, Corrientes, Buenos Aires y Salta.

Para el 2005, en el CHP el pimiento ocupó un total de 177,604 has y se estimó una producción de 9.535,242 tn (CHFBA, 2005). El 40% de la superficie se destina a cultivos protegidos (invernaderos) y el resto está ocupado por cultivos a campo. En general, las unidades de producción tienen una superficie media de 5,1 ha y se llaman "Quintas" (Stavisky, 2010; García, 2012). Actualmente el cultivo se inicia por almácigo y trasplante con pan de tierra. Esta alternativa le permite al productor lograr cosechas más tempranas y amortizar los costos del invernáculo y del cultivo (Del Pino, 2020).

Morfología y Ecofisiología

El pimiento, *Capsicum annuum* L, pertenece a la familia de las Solanáceas. Es una planta herbácea, de cultivo generalmente anual, y que puede en algunos casos, transformarse en bianual. Posee un sistema radical pivotante y profundo cuando se inicia mediante el sistema de siembra directa que puede llegar a 1,2 m de profundidad. En los cultivos iniciados por trasplante el sistema radical es más superficial. El tallo es erecto de hasta 2 m o más de altura, anguloso y provisto de ramificaciones dicotómicas, glabro en

las variedades cultivadas y pubescentes en los tipos espontáneos. Las hojas son alternas, brillantes con lámina ovada o elíptica y margen entero. Las flores son hermafroditas, de fecundación autógena, presentan corolas de color blanquecino en posiciones normalmente solitarias (Ludvik *et al.* 2017). El fruto es una baya semicartilaginosa, de estructura hueca, llena de aire, con forma de cápsula; está conformada por un pericarpio grueso y jugoso en las variedades para consumo fresco (formado a su vez por el epicarpio, mesocarpio y endocarpio) y un tejido placentario al que se unen las semillas (Del Pino, 2020). Presentan un alcaloide denominado “capsicina” (con mayor localización en la placenta interna) responsable del sabor picante. Dicho compuesto es variable en los diversos cultivares por lo que se encuentran grados diversos de sabor pungente. Las semillas son reniformes, aplastadas, de color marrón claro y levemente pubescentes (Ludvik *et al.* 2017).



Foto 1: Cultivo de pimiento bajo invernáculo. Fuente: Procesos fisiológicos y productivos óptimos en pimiento – Editorial De Riego (2020).

Entre los factores ambientales que controlan el crecimiento se encuentran la radiación fotosintéticamente activa (el uso eficiente de la radiación recibida es un elemento crucial en la acumulación de fotoasimilados y la formación de una biomasa activa), el agua y los nutrientes. Bajo condiciones hídricas del sustrato óptimas, el

pimiento requiere una temperatura mínima de germinación de 10,9°C, mientras que la suma térmica requerida para germinación se encuentra en 182 °C día (Bierhuizen & Wagenvoort, 1974). El estado de maduración del fruto en el momento de la extracción de las semillas (inmaduro, completamente maduro o sobre madurado) afecta su respuesta germinativa (Cavero *et al.*, 1995). Es máxima cuando finaliza la etapa de llenado de las semillas y tanto la viabilidad como el vigor comienzan a declinar a partir de ese momento (Demir & Ellis, 1992). Todos los cultivares de pimiento exhiben termo-dormición cuando la imbibición se realiza a altas temperaturas (40 °C) (Carter & Vavrina, 2001).

El crecimiento vegetativo posee temperatura base de 10°C y demanda entre un 50-70% de humedad relativa. La inducción floral es por suma térmica y la diferenciación responde a la amplitud térmica (Del Pino, 2020). Los suelos más adecuados para su cultivo son profundos, con buen drenaje y pH 7. Es medianamente tolerante a la salinidad: a partir de 2,5 ms/cm de CE ocurren importantes pérdidas de rendimiento (Berrios Ugarte *et al.* 2007).

Suspensión de bromuro de metilo: reaparición de nematodos

La producción intensiva trae aparejada la aparición de diversas plagas y enfermedades. Entre los métodos empleados para el control, la desinfección del suelo se transformó en una práctica de manejo prácticamente obligatoria en estos sistemas. Existen numerosas posibilidades para llevar adelante esta práctica, sin embargo, la más adoptada por los productores es el control químico. El uso del fumigante bromuro de metilo (CH₃Br) se generalizó debido a su gran poder biocida y a la practicidad para ser aplicado. De acuerdo a lo establecido en el protocolo de Montreal en 1987 y ratificado por Argentina en 1990, se acordó que este producto debía ser retirado del mercado en el año 2015 por ser un gas que contribuye a la destrucción de la capa de ozono (Adlercreutz *et al.* 2007). Además de contaminante es tóxico para la salud humana,

razón suficiente para su prohibición en el país, aunque se dispuso que por cinco años más se pueda usar, pero en “cantidades mínimas y con declaración jurada de cómo se debe utilizar”, y que se dejaría de utilizar definitivamente en el 2020 (Puertas *et al.* 2006). Argentina se encuentra en búsqueda de alternativas sustentables para la sustitución del bromuro de metilo (CH₃Br).

El uso indiscriminado de este producto derivó en una presión de selección muy alta, campaña tras campaña. La suspensión de este fumigante trajo aparejada la reaparición de importantes adversidades bióticas para los cultivos de la región, como los nematodos noduladores, destacando así la importancia de rediseñar programas de manejo integrado (Puertas *et al.* 2006).

Nacobbus aberrans Thorne & Allen, conocido como el “nematodo del rosario” o “falso nematodo agallador”, es un endoparásito fitófago que produce agallas en las raíces de las plantas. Responsable de producir importantes pérdidas en la producción de numerosos cultivos hortícolas, incluido el pimiento (Manzanilla López *et al.* 2002). Este nematodo reúne una serie de características que la hacen diferente de otros nematodos del suelo. Entre ellas, se destacan su polifagia, elevado potencial reproductivo y notable capacidad de adaptación, características por lo que se encuentra ampliamente distribuido, abarcando diferentes regiones geográficas de nuestro país (Doucet & Lax, 2005). Su ciclo de vida dura de 25 a 59 días, variando en función de las poblaciones específicas, tipo de hospedantes y condiciones ambientales. Presenta anhidrobiosis, estado que le permite sobrevivir bajo condiciones de desecación del suelo por más de ocho meses, característica que dificulta su control (Sánchez Delgado, 2007). A nivel celular, se han registrado alteraciones de la morfología y fisiología de las células del pimiento que corresponden a respuestas de hiperplasia e hipertrofia (Hewezi & Baum, 2013). Estas alteraciones provocadas por las agallas que se forman en las raíces derivan en la ruptura del xilema y floema. Como consecuencia se reduce el flujo de

sustancias a través de los tejidos de conducción y las plantas sufren marchitez, deficiencias de N, P, K, Ca y Mg, baja conductancia estomática y en consecuencia baja asimilación de CO₂, disminución del crecimiento, pérdidas del rendimiento e incluso la muerte de la planta (Castillo & Marbán-Mendoza, 1984).

Nacobbus aberrans

Conocido como el “nematodo del rosario”, *N. aberrans*, constituye una de las adversidades bióticas más importantes en los cultivos bajo cubierta del CHP. Provoca anualmente importantes pérdidas económicas ya sea por la disminución en el rendimiento, o por el elevado costo de los fumigantes aplicados al suelo. Los datos formales sobre el daño económico causado por este nematodo son escasos. Un informe de INTA-Mar del Plata indica que los daños en tomate y pimiento alcanzan el 40 % (Adlercreutz *et al.* 2007).

Clasificación taxonómica

Reino: Animalia

Filo: Nematoda

Clase: Secernentea

Orden: Tylenchida

Familia: Pratylenchidae

Subfamilia: Nacobbinae

Género: *Nacobbus*

Especie: *Nacobbus aberrans* Thorne & Allen

Características morfológicas y ciclo biológico

Es una especie anfimíctica, con un marcado dimorfismo sexual respecto a la forma del cuerpo. Los machos son filiformes (0.7-1.2 mm de largo) mientras que, las hembras son fusiformes y voluminosas de (0.7-1.9 mm de longitud) (foto 2).

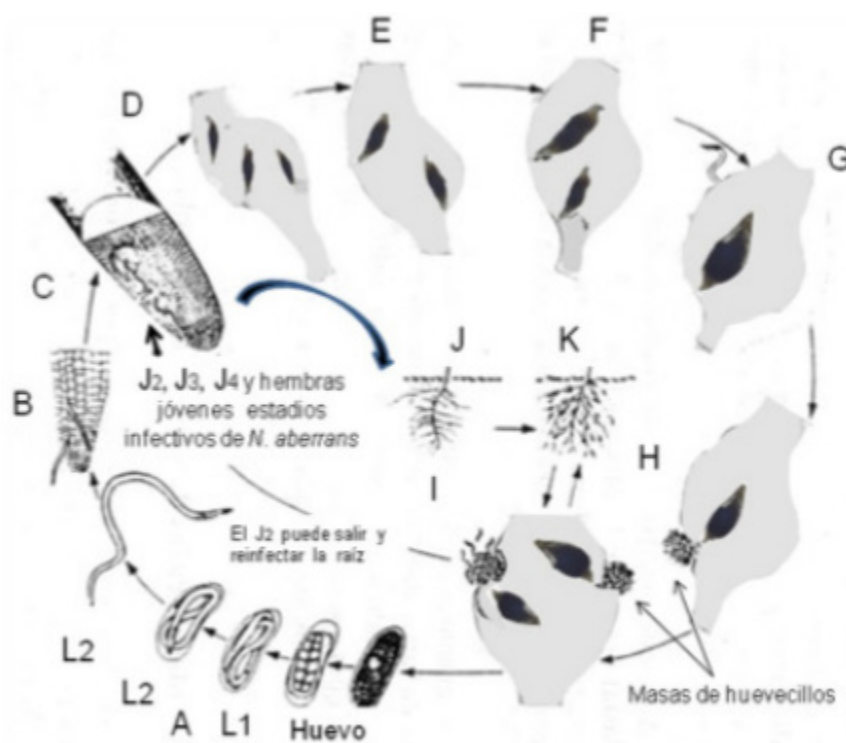
Parte del ciclo de vida (figura 3) se desarrolla en el suelo y parte en los tejidos del hospedador. La duración del ciclo varía según la temperatura y la disponibilidad de alimento. En condiciones óptimas (22-24°C) puede oscilar entre 37 - 48 días (Costilla, 1985). Dicho ciclo comprende cuatro estadios juveniles y los adultos. El primer estadio (J1) se desarrolla en el interior del huevo. Luego de una muda, el segundo estadio juvenil (J2) emerge al exterior y se desplaza en el suelo en busca de un hospedador adecuado. Las larvas se alimentan del citoplasma de células del parénquima cortical perforando las paredes con ayuda de su estilete. A medida que el nematodo se va alimentando, muda pasando por el tercer (J3) y cuarto estadio juvenil (J4). Posteriormente, darán lugar a un individuo filiforme: hembra inmadura (también llamada hembra joven) o a un macho. La hembra inmadura penetra en el interior de la raíz y se fija a proximidad del cilindro central en donde induce el desarrollo de su sitio de alimentación (síncito). Esto da lugar a una serie de alteraciones histológicas y fisiológicas particulares en esa zona del sistema radical del hospedador. Con el transcurso del tiempo, el nematodo pierde su aspecto filiforme y se torna voluminoso con apariencia de huso o cigarro (hembra madura). Puede llegar a adoptar formas muy variables según sea la rigidez de los tejidos del vegetal entre los que se desarrolla. Una vez fecundada, la hembra produce una masa gelatinosa en la que se depositan entre 40-800 huevos y que, generalmente, queda sobre la superficie de la agalla, en contacto con el suelo. Los huevos eclosionarán continuando con el ciclo de vida de la especie o se mantendrán en la matriz mucilaginosa hasta que aparezcan condiciones ambientales favorables (Doucet & Lax, 2005). Las masas de huevos tienen la capacidad de soportar

condiciones adversas, tales como las bajas temperaturas (hasta -13°C) y la desecación por períodos prolongados de tiempo (González & Franco, 1997).



Foto 2:

Huevos y juveniles B-adulto. C-adulta propia,



A-estados Macho Hembra (fuente 2020).

Figura 3: Representación del ciclo completo de *N. aberrans* (Fuente: Sánchez Portillo, 2010). Referencias: A) etapa embriogénesis, B) segunda etapa larvaria, ataca raíces, C) J2, J3, J4 y hembras jóvenes invaden la raíz como inoculo primario, D) J2 se alimentan de células puede salir y reinfestar la raíz formando falsos nudos, E) tercera etapa larvaria, F) cuarta etapa larvaria, G) nematodos adultos, el macho abandona la raíz, H) hembra deposita huevos en ovisaco, I) las agallas contienen hembras ovipositoras, J) y K) índice de agallamiento.

Alternativas de control

El control de esta plaga se basa principalmente en el uso de desinfectantes de suelo (bromuro de metilo) y nematicidas químicos (Adlercreutz *et al.* 2007). En nuestro

país, como ya se mencionó, está prohibida la utilización del bromuro de metilo por lo que hay que buscar alternativas de manejo, que deben ser eficaces, no impactar negativamente sobre el medio ambiente, ser económicamente viables y socialmente aceptadas (Bello *et al.* 2000). Entre las prácticas de bajo impacto ambiental se pueden destacar el uso de agentes biológicos (Puertas *et al.* 2006), la solarización (Alcoser *et al.* 2006), la incorporación de enmiendas orgánicas biofumigantes (Bongiorno *et al.* 2009) y la aplicación de aceites esenciales (Gupta *et al.* 2011). En los últimos años, el control biológico se ha convertido en un método eficiente, económico y no contaminante (Lax *et al.*, 2011) y puede realizarse mediante la aplicación de distintos organismos como hongos micorrícicos arbusculares (HMA), hongos nematófagos y algunos géneros de bacterias entomopatógenas. Los HMA pueden conferir tolerancia a patógenos a través de diferentes mecanismos de acción (Linderman *et al.* 1992), entre los que se encuentran el micoparasitismo, la lisis enzimática, la antibiosis, la competencia por espacio o por nutrientes, y la inducción de resistencia en la planta. Los hongos nematófagos ejercen un control sobre las poblaciones de nematodos atrapando a las formas juveniles con diferentes estructuras especializadas (como anillos constrictores y no constrictores y extremos pegajosos) o bien mediante parasitismo de huevos como es el caso de *Purpureocillium lilacinus* (Thorne) Sayre & Starr (Flores-Camacho *et al.* 2008; Cavello *et al.*, 2015). La bacteria entomopatógena más conocida en el control biológico es *Bacillus thuringiensis* Berliner. Más del 90 % del mercado de bioinsecticidas incluye productos a base de esta bacteria (Glare & O'Callaghan, 2000). Su actividad como nematicida es debida al complejo de toxinas que produce durante su crecimiento, principalmente las b-exotoxinas y d-endotoxinas (Márquez Gutierrez & Fernandez Gonzalez, 2006).

Microrganismos benéficos para el control de *N. aberrans*

Paecilomyces lilacinus (Purpureocillium spp.)

El género *Purpureocillium* presenta conidióforos ramificados, agrupados o irregulares, en forma de cadena. Tiene un crecimiento rápido de sus hifas. Las colonias alcanzan 5 a 7 cm en 14 días a una temperatura de 25°C presentando un color lila. El rango óptimo de temperatura para su desarrollo va de los 26 a 30°C y un pH de 2 a 10 (Acosta, 2006).

Clasificación taxonómica:

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: *Purpureocillium*

Especie: *Paecilomyces (=Purpureocillium) lilacinus* (Thorne) Sayre y Starr.

Los hongos de este grupo se caracterizan por el hábito de parasitar nematodos y otros organismos. Este hongo es normalmente saprófito y produce un espeso micelio de donde se forman los conidióforos. La producción de conidióforos, y por ende la concentración final de conidios, puede verse afectado o estimulado dependiendo de la concentración de humedad y la disponibilidad de nutrientes. Sus hifas normalmente poseen una textura lisa y presentan un espesor entre 3 y 5 µm. A partir de estas estructuras se levantan conidióforos que pueden llegar a tener hasta 650 µm, los cuales producen conidios con carácter fusiforme. El crecimiento y desarrollo del hongo es posible entre las temperaturas de 8 a 38°C, teniendo un crecimiento óptimo entre 26 y 30 °C (Inglis *et al.* 2000).

El ciclo biológico de hongos imperfectos comprende cinco pasos principales los cuales son: dormancia de los conidios, germinación, infección, desarrollo de micelio y

conidiogénesis. El desarrollo de micelio y producción de conidios viables está directamente relacionado con la disponibilidad de fuentes de nitrógeno y carbono, además del método de inoculación, salinidad del sustrato, relación carbono/nitrógeno, aireación, contenido de humedad, entre otros (Mukhtar *et al.* 2013) Los conidióforos son caracterizados por tener un reducido movimiento de agua, ausencia de movimiento citoplasmático y una baja actividad metabólica. Bajo condiciones favorables, los conidios germinan formando un tubo vegetativo, el cual será la base para el futuro micelio (Brand *et al.*, 2010).

Mukhtar *et al.* (2013) indican que las hifas de *P. lilacinus* penetran fácilmente la cáscara de los huevos de *Meloidogyne arenaria* Chitwood (1949), los cuales una vez invadidos se hinchan como resultado de la alteración de permeabilidad de la pared y sufren una serie de cambios estructurales. Por su parte Brand *et al.* (2004), señalan que la capa vitelina se divide en tres membranas separadas, la capa de quitina se torna vacuolada y la capa lipídica desaparece, provocando la destrucción del embrión. En la mayoría de los casos el hongo no sólo ataca las masas de huevos, sino también penetra en el cuerpo de las hembras adultas ovíparas y las destruye.

Kiewnick & Sikora (2005), indican que este hongo presenta varios mecanismos de acción, pero el principal está asociado al ataque en etapas sedentarias, en particular a los huevos de nematodos enquistados o sedentarios, produciendo leucinotoxinas, quitinasas, proteasas y ácido acético, compuestos directamente relacionados con el proceso de infección; se ha demostrado que *P. lilacinus* penetra directamente todos los estados del nematodo luego de la formación del apresorio. Después de la adhesión *P. lilacinus* forma un apresorio para adherirse a la superficie de acogida y lograr la penetración. Esta estructura libera enzimas, secretadas para degradar los sustratos

adyacentes con lo que establece un punto de infección mucho más estrecho y así lograr la penetración del huésped (Gunasekera *et al.*, 2002).

Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis es una bacteria del suelo, anaerobia facultativa, móvil y esporogénica, perteneciente al grupo de bacterias Gram positivas conformado por *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* (Lecadet, 1970).

Clasificación taxonómica:

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: Bacillus

Especie: *Bacillus thuringiensis*.

Se caracteriza porque luego de la fase de crecimiento exponencial, las células producen tanto una espora subapical como uno o varios cuerpos parasporales: inclusiones compuestas de una o más proteínas cristalinas (ICPs) que tienen actividad insecticida específica, incluso a nivel de especie (Lecadet, 1970; Schnepf *et al.* 1998).

Los cristales están constituidos por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry y Cyt. Se han encontrado δ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nematodos, gusanos planos y protozoarios (Bravo, 1992).

Estas proteínas tóxicas que *B. thuringiensis* produce, en términos generales, son las más usadas en insecticidas naturales en la agricultura ya que ofrecen una notable alternativa a los pesticidas químicos. No son tóxicos para los vertebrados, son más benignos al ambiente, y por medio de la ingeniería genética pueden ser introducidas a los cultivos para proveer una constante protección (Ziquan *et al.* 2008). A la fecha a seis proteínas Cry (Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, Cry21) se les conoce su actividad tóxica para larvas de nematodos de vida libre o parásitos (Wei *et al.* 2003; Mohammed *et al.*, 2008).

Con el uso de nuevas alternativas de control como son los derivados de *B. thuringiensis*, se espera que esta bacteria contribuya a fortalecer los programas sanitarios en contra de nematodos parásitos que afectan a mamíferos y a plantas. Las d-proteínas de *B. thuringiensis* han mostrado ser inocuas al ser humano y a otros mamíferos, y aunque su efecto nematocida es poco conocido. *B. thuringiensis* es una herramienta de control con posible potencial tóxico en contra de nematodos de importancia veterinaria y agrícola (De Maagd, 2001).

Rhizophagus intraradices

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA), son las asociaciones más comunes que se establecen con la mayoría de las especies de plantas, y probablemente son, en abundancia, las más importantes (Sarabia Ochoa *et al.*, 2010). La micorrización es una interacción (simbiosis) entre especies de hongos del orden Glomales y las raíces de la mayoría de las plantas. Entre las plantas que forman este tipo de asociaciones se encuentran la mayoría de las leguminosas herbáceas y muchas leñosas, los cereales, los frutales y la gran mayoría de los cultivos hortícolas (Quilambo, 2003).

Clasificación taxonómica

Filo: Glomeromycota

Orden: Glomerales

Familia: Glomeraceae

Género: Rhizophagus

Especie: *Rhizophagus intraradices*.

Estos hongos son simbioses obligados de las plantas superiores (Barea, 2000), reciben fotoasimilados de las plantas, a las que les proporcionan nutrientes y agua que absorben del suelo (Smith & Read, 2008). La simbiosis facilita la captación de fósforo, un nutriente limitante en la mayoría de los suelos. También influye directa o indirectamente en la absorción de otros iones minerales (N, K, Ca, Mg, Fe, Mn). Promueven un mayor crecimiento de las plantas especialmente en aquellos suelos donde estos nutrientes son escasos. El hongo por su parte, depende completamente de la planta para obtener los carbohidratos que requiere para su desarrollo (Sarabia Ochoa *et al.*, 2010). Entre otras ventajas de esta asociación en los sistemas suelo-planta se ha estudiado la inducción de una mayor tolerancia/resistencia frente a distintos estreses bióticos y abióticos. También se ha investigado el incremento de la tolerancia de las plantas micorrizadas al estrés hídrico, salino, por deficiencia de nutrientes, exceso de metales pesados y sustancias fitotóxicas (Ruscitti *et al.* 2011; Kaya *et al.* 2009; Beltrano *et al.* 2013).

Las micorrizas pueden conferir tolerancia a patógenos a través de diferentes mecanismos de acción (Linderman, 1992), entre los que se encuentran el micoparasitismo, la lisis enzimática, la antibiosis, la competencia por espacio o por nutrientes, y la inducción de resistencia en la planta. La producción de sustancias fúngicas es uno de los mecanismos más estudiados. El micelio extrarradicular de las micorrizas libera una serie de compuestos que tienen un efecto supresor y/o estimulante en el sustrato circundante. Filión *et al.* (1999), reportaron la estimulación del crecimiento

de *Pseudomonas chlororaphis* y *Trichoderma harzianum* por exudados de los HMA, mientras que la germinación de conidios de *Fusarium oxysporum f. sp. chrysanthemi* se redujo y el crecimiento de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* no se vio afectado. También la competencia por espacio y fuente carbonada. El crecimiento de los hongos micorrícicos y el de muchos organismos fitopatógenos depende de los fotosintatos provistos por la planta huésped, por lo que existe una competencia por la captación de éstos. Cuando los HMA colonizan las raíces de forma temprana, la mayor demanda de carbono puede inhibir el crecimiento de los patógenos (Larsen & Bødker, 2001). Es por este motivo que se ha sugerido que la competencia por nutrientes, especialmente carbono, es la principal causa del efecto de biocontrol mediado por HMA (Jung *et al.*, 2012). Del mismo modo, existe una competencia por el sitio, ya que al igual que los hongos formadores de micorrizas arbusculares muchos patógenos tienen un crecimiento inter e intracelular en la planta (Pozo *et al.* 2010).

El proceso de colonización comienza con la germinación de las esporas que se encuentran en el suelo o en las raíces de las plantas, las que desarrollan uno o varios tubos germinativos que se extienden hasta encontrar la raíz para colonizarla (Giovannetti *et al.*, 1993). Cuando una hifa (foto 3 b) alcanza la superficie de la raíz forma una estructura llamada apresorio, producto de la ramificación y engrosamiento de la pared celular de la hifa. Luego la hifa penetra en la raíz de la planta. El proceso de colonización continúa con la formación de hifas intercelulares que colonizan la corteza radical, dando lugar a las estructuras características de esta simbiosis que son los arbusculos (foto 3 c), ramificaciones dicotómicas repetidas de hifas intracelulares. Estas estructuras son las encargadas del intercambio bidireccional de nutrientes y carbono entre el hongo y la planta (Smith & Read, 2008). Junto al desarrollo del hongo dentro de la raíz se produce una proliferación de hifas en el suelo lo que constituye el micelio externo o extraradical

fundamental para la adquisición de agua y nutrientes por las plantas, ya que permite explorar microhábitats del suelo inaccesibles para las raíces (Barea, 2000).

Algunos hongos micorrícicos producen también vesículas (foto 3 a), estructuras que tienen como función el almacenamiento de sustancias, especialmente lípidos. Se forman en los extremos de las hifas inter o intracelularmente a medida que progresa la infección (Bécard & Pfeffer, 1993).

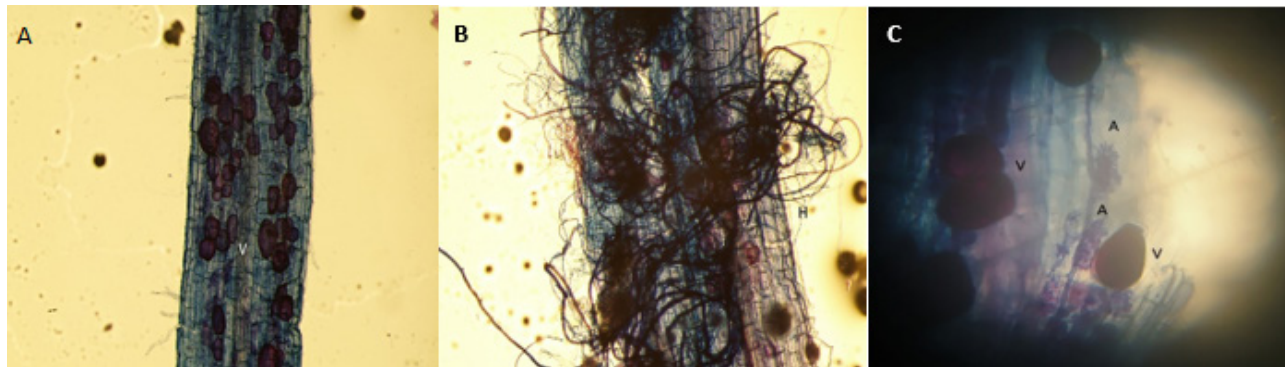


Foto 3: A- Vesículas de *Rhizophagus intraradices* B1, B- Hifas de *Rhizophagus intraradices* B1. C- Arbúsculos y vesículas de *Rhizophagus intraradices* B1 (fuente propia, 2020).

Si bien existen antecedentes del uso de los microorganismos mencionados para el control de plagas, poco se conoce de la posibilidad de emplear estas herramientas en forma conjunta. Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, el estudio de las interacciones entre los diferentes bioinsumos (hongos micorrícicos arbusculares, hongos nematófagos y bacterias) permitirá incorporarlos en programas de control de nematodos fitoparásitos como una alternativa sustentable para solucionar los problemas ocasionados por esta plaga en el cultivo de pimiento.

HIPÓTESIS

La presencia del nematodo *Nacobbus aberrans* en el suelo afecta el crecimiento de las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivadas bajo cubierta. La asociación

con hongos micorrícicos arbusculares, hongos nematófagos y *Bacillus thuringiensis* morigeros la actividad fitopatógena de *N. aberrans*, mitigando los daños provocados sobre las plantas de pimiento.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de diferentes bioinsumos y su sinergismo, en el crecimiento de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) y en la reducción de la población de *Nacobbus aberrans*, para mantenerla por debajo del umbral de daño económico para este cultivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar las respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que produce la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares, hongos nematófagos y bacterias promotoras del crecimiento vegetal, solos o combinados, en plantas de pimiento afectadas por *N. aberrans*.

2. Cuantificar el efecto del uso individual y combinado de los diferentes microorganismos en estudio, sobre la población de *N. aberrans* en el cultivo de pimiento.

ACTIVIDADES Y METODOLOGIA

El trabajo experimental se realizó en condiciones semicontroladas de temperatura en un invernáculo perteneciente al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP).

Condiciones de cultivo

Se utilizaron semillas de pimiento variedad "Fyuco", las cuales se sembraron en speedlings plásticos, previa desinfección con NaOCl (10 %) durante 5 minutos. Para la siembra se utilizó como sustrato una mezcla de perlita- vermiculita (1:1), previamente autoclavada (foto 4 a). Las plantas provenientes de los almácigos se trasplantaron en

macetas de 5 litros conteniendo una mezcla de tierra y arena (1:1) tinalizada durante tres días consecutivos, a las que se aplicaron los inoculantes en forma individual y combinada, a fin de determinar las combinaciones efectivas para la protección frente al ataque de *N. aberrans* (foto 4 b).

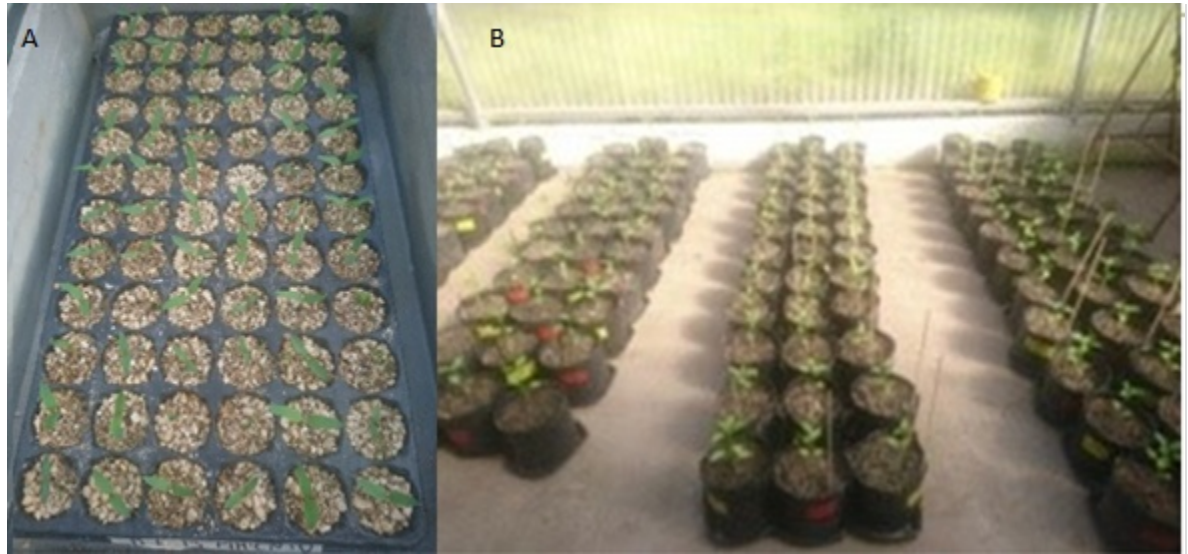


Foto 4: A - Siembra en speedling plásticos. B- Plantas trasplantadas en macetas de 5 litros (Fuente propia, 2019).

Tratamientos realizados

El ensayo tuvo un diseño completamente al azar con 9 repeticiones por tratamiento. De esta forma quedaron definidos los siguientes tratamientos:

A - No inoculado con *N. aberrans* (SN):

1- Control (sin inoculación con microorganismos benéficos).

2- Inoculado con *Rhizophagus intraradices* B1 (B1).

3- Inoculado con *Paecilomyces lilacinus* (PL).

4- Inoculado con *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT).

5- Inoculado con *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL).

6- Inoculado con *Rhizophagus intraradices* B1 y *Bacillus thuringiensis* var.

Kurstaki (B1 BT).

7- Inoculado con *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (BT PL).

8- Inoculado con *Paecilomyces lilacinus*, *Rhizophagus intraradices* B1 y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (B1 BT PL).

B - Inoculado con *N. aberrans* (CN):

1- Control (sin inoculación con microorganismos benéficos).

2- Inoculado con *Rhizophagus intraradices* B1 (B1).

3- Inoculado con *Paecilomyces lilacinus* (PL).

4- Inoculado con *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT).

5- Inoculado con *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL).

6- Inoculado con *Rhizophagus intraradices* B1 y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (B1 BT).

7- Inoculado con *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (BT PL).

8- Inoculado con *Paecilomyces lilacinus*, *Rhizophagus intraradices* B1 y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (B1 BT PL).

Preparación del inóculo micorrízico

Se utilizó inoculante micorrízico producido a partir de *Rhizophagus intraradices* cepa B1 del Banco de Glomeromycota In Vitro (UBA). La multiplicación de la misma se realizó utilizando como plantas trampas trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y lotus (*Lotus tenuis* L.) (foto 5), que se cultivaron en un sustrato compuesto por perlita-vermiculita-arena (1:1:1), previamente tinalizado (100°C durante 1 hora por día, tres días consecutivos). Las plantas se mantuvieron en cámaras de crecimiento (25 +/- 2 °C, fotoperíodo de 16 horas y 350 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de irradiancia) durante 90 días. Al cabo de ese tiempo, las plantas se dejaron secar para luego eliminar la parte aérea. Las raíces

se cortaron en fragmentos pequeños mezclándolas en forma homogénea con el sustrato, constituyendo el inóculo, una mezcla de sustrato, hifas, esporas y fragmentos de raíces de trébol y lotus micorrizadas en un 90%, con una densidad de $60 \text{ esporas.g}^{-1}$ de sustrato. La elección de esta cepa de HMA se basó en resultados previos y referencias bibliográficas donde se demostró su capacidad para mitigar los efectos del estrés, además de la factibilidad para ser multiplicada. Las plantas que se utilizaron en el ensayo se inocularon a la siembra con 30% v/v de este inóculo.



Foto 5: Plantas trampas de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y lotus (*Lotus tenuis* L.) (Fuente propia, 2019).

Preparación del inóculo del hongo nematófago

Se utilizó una cepa de *Paecilomyces lilacinus* proveniente del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas (UNLP). En una primera instancia se repicó el inóculo inicial en cajas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado (APG) 1,5%, pH 6 en cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones (foto 6 A). Se incubaron las cajas en oscuridad a 28°C por siete días aproximadamente cuando el medio de cultivo estaba completamente colonizado por el hongo (Inalbón *et al.* 2015). Para la multiplicación del inóculo se utilizaron botellas (foto 6 B) con sustratos formulados con semillas de avena y viruta de

madera de salicáceas en donde se incorporaron los medios de cultivo colonizados. La incubación de los cultivos bajo condiciones de fermentación en estado sólido se realizó en cámara de cultivo a 28°C y en oscuridad durante 30 días (Inalbón *et al*, 2015). Una vez que las botellas estaban completamente colonizadas se consideraron en condiciones de ser utilizadas. La elección de esta especie se basó en el reconocido efecto nematocida evidenciado en diversas publicaciones científicas, principalmente sobre el género *Meloidogyne*, siendo escasa la información sobre *Nacobbus*. Las plantas que se utilizaron en el ensayo se inocularon al trasplante con 10% v/v de este inóculo.

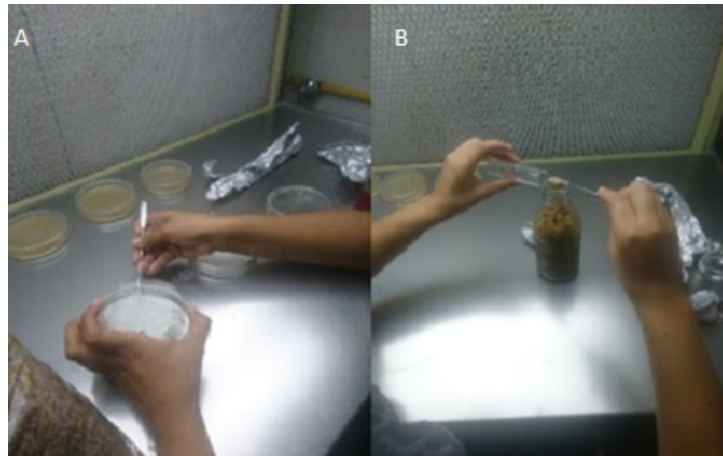


Foto 6: A- Preparación y repique del inóculo inicial del hongo nematófago en cajas de Petri B- Multiplicación en botellas (Fuente propia, 2019).

Preparación del inóculo de las bacterias

Las bacterias, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki, que se utilizaron en el ensayo fueron de origen comercial (Bac-thur ®). Seleccionadas por sus antecedentes bibliográficos en el control de nematodos. Las plantas se inocularon 7 días después del trasplante con este inóculo (1×10^7 ufc/ml), y luego cada 15 días hasta la finalización del ensayo.

Preparación del inóculo del nematodo

Se utilizó como inóculo una población monoxénica, obtenida a partir del cultivo en contenedores de plantas inoculadas con una masa de huevos de *N. aberrans* (N) proveniente de invernaderos del CHP, multiplicado sobre plantas de tomate platense. Utilizando las técnicas de Hussey & Barker (1973) y de Coolen (1979), se extrajeron los huevos procesando las raíces con una mezcla de agua e NaOCl (1 %) en una licuadora, posteriormente se tamizó (poro de 37 μ m) y se centrifugó con caolín y sacarosa. Se retiró el sobrenadante donde se encuentran los huevos, se enjuagaron con agua y se conservaron en heladera hasta la inoculación de las plantas. Tres días después del trasplante, la mitad de las plantas se inocularon con 5000 huevos del nematodo.

PARÁMETROS DETERMINADOS

Incidencia en el crecimiento de las plantas

Semanalmente en cada una de las plantas de los diferentes tratamientos se midió diámetro al cuello con un calibre manual y altura desde el suelo al ápice empleando una cinta métrica.

Índice de verdor

Se determinó el índice de verdor semanalmente utilizando el medidor portátil SPAD 502® (Minolta Co. Ltd., Japan) (foto 7). El procedimiento consistió en estimar el contenido relativo de clorofila total (a+b) presente en la hoja (unidades SPAD relativas de Minolta), mediante la medición de la absorción de la hoja en dos regiones de longitud de onda, roja y cercana a infrarroja. Utilizando estas dos transmisiones el medidor calcula el valor numérico SPAD, que es proporcional a la cantidad de clorofila presente en la hoja (Hoel & Solhaug, 1998).



Foto 7: Medidor SPAD (Biaus, 2017).

Conductancia estomática

La conductancia estomática se midió con un Porómetro DC 1 (Decagon) que registra la transpiración y es un indicador de la conductancia estomática. La conductancia estomática fue medida al principio y al final del ensayo cuando las condiciones climáticas (baja a moderada nubosidad) lo permitieran sobre una hoja totalmente expandida.

A los 90 días después del trasplante se levantó el ensayo y se realizó un muestreo de hojas y raíces para determinar los siguientes parámetros:

Rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII)

Para medir este parámetro se empleó un medidor de fluorescencia modulada de la clorofila, utilizando el método del pulso saturante (Tambussi & Graciano, 2010) Fluorímetro FMS2, Hansatech. Se eligieron 10 plantas de cada tratamiento y sobre hojas totalmente expandidas y no senescentes se le colocaron pinzas (“clips”) especiales, provistas por el fabricante del equipo, que permiten oscurecer un sector de la hoja a

medir por 30 minutos a modo de aclimatar a la oscuridad y relajar los 15 mecanismos de disipación no fotoquímica. Este coeficiente F_v/F_m puede tomar valores entre 0 y 0,85 y connota una relación directa con el porcentaje de centros funcionales del fotosistema II.

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

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

Determinación de la conductividad relativa de las membranas celulares de hojas y raíces mediante el método de Lutts *et al.* (1996).

La determinación de la conductividad relativa de las membranas celulares se realizó a partir de 4 discos de material fresco de hojas y el equivalente en peso fresco de raíces. Inmediatamente después del muestreo, los tejidos se lavaron tres veces con agua bidestilada durante 15 segundos, para eliminar los electrolitos adheridos a la superficie y aquellos liberados por las heridas producidas por el corte. Posteriormente, cada muestra se sumergió en un tubo con 10 ml de agua bidestilada donde permanecieron durante cuatro horas a temperatura ambiente. Seguido a esto, se determinó la conductividad eléctrica (dS m^{-1}) empleando un conductímetro Jenco modelo 3173. Luego, los tubos se taparon y se llevaron al autoclave donde se mantuvieron por 20 minutos a una presión de una atmósfera y $120 \text{ }^\circ\text{C}$, con el objetivo de afectar totalmente la integridad de las membranas. Finalmente, los tubos se dejaron enfriar a

temperatura ambiente y se volvió a medir la conductividad eléctrica del medio. En base a los datos obtenidos, se estimó la conductividad relativa de las membranas celulares a partir de la siguiente fórmula:

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

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

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

El contenido de proteínas solubles se determinó a partir de 100 mg de la última hoja expandida e igual peso de raíz, de acuerdo al método de Bradford (1976). Los tejidos se homogeneizaron en un mortero con 1 ml del buffer de extracción (TRIS 50 mM, EDTA 1mM, PVPP insoluble 1%, MeSH 0,1% a pH 7,5) a 4°C. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se tomaron 100 µl del sobrenadante y se le agregó 5 ml del reactivo Azul Brillante de Coomassie, se agitó en vortex y se leyó la absorbancia a 595 nm. El cálculo de la concentración de proteínas se efectúa empleando una curva patrón preparada con distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA, SiFMA Chemical Co).

Determinación del contenido de clorofila y carotenos según el método de Wellburn (1994).

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

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g cm}^{-2}) = 12 \times \text{Ab663.8} - 3.11 \times \text{Ab646.8}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g cm}^{-2}) = 20.78 \times \text{Ab646.8} - 4.88 \times \text{Ab663.8}$$

$$\text{C total a+b } (\mu\text{g cm}^{-2}) = 17.67 \times \text{Ab646.8} + 7.12 \times \text{Ab 663.8}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g cm}^{-2}) = (1000 \times \text{Ab480} - 1.12 \text{ Ca} - 34.07 \text{ Cb}) / 245$$

Micorrización: Tinción de raíces micorrizadas mediante el método de Phillips & Hayman (1970).

Se seleccionaron en forma aleatoria fracciones de raíces no lignificadas y se procedió a clarificar y teñir. Las raíces se aclararon con KOH al 10% (p/v) (10 min., 100°C). Luego se lavaron tres veces con agua y se aplicó una solución de HCl 0,1N (5 min. a T° ambiente). Finalmente se tiñeron con azul de Tripán (5 min. a 95°C). El colorante tiñe de color azul las estructuras del hongo que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de los hongos micorrícicos arbusculares. Luego las raíces se conservaron en una solución de lacto-fenol. Fragmentos de raíces teñidas, de aproximadamente 1cm de longitud, se montaron en portaobjetos (foto 8) añadiendo gotas de ácido láctico y se cubrieron con un cubreobjeto observándose al microscopio óptico. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento, cada una de 10 fragmentos de raíz. De cada muestra se observó la presencia de campos negativos (sin presencia de estructuras fúngicas) y positivos (con presencia de estructuras fúngicas). En los campos positivos se tuvo en cuenta el tipo de estructuras (arbúsculos, vesículas, hifas) presentes dentro de la raíz.

El porcentaje de micorrización (% M) se calculó como la proporción de raíces infectadas sobre el número total de fragmentos de raíz observados, calculando también el porcentaje de arbusculos (% Ar) y vesículas (% V).

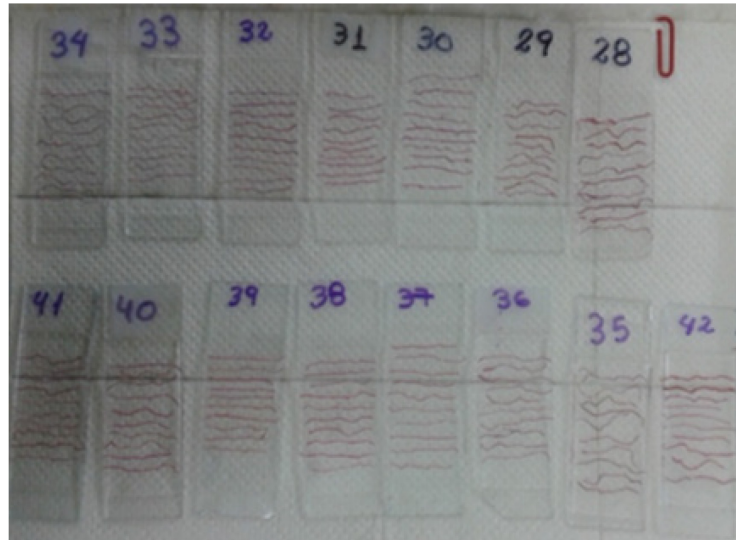


Foto 8: Raíces de pimiento teñidas y preparadas para su observación en microscopio óptico (Fuente propia, 2020).

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

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

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

Para poder facilitar el conteo de huevos obtenidos de las raíces por la técnica de Hussey & Barker (1973) se aplicó sobre la suspensión de huevos la técnica de centrifugación- flotación descrita por Coolen (1979). A la suspensión de huevos, se le adicionó 5 cm³ de caolín por cada 50 cm³ de suspensión. Se agitó hasta lograr una mezcla homogénea y se distribuyó en tubos de centrífuga. Se realizó una primera centrifugación durante 5 minutos a 1000g. Finalizada la centrifugación el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido con una solución de sacarosa con densidad 1,18 gr/L (484 gr de azúcar comercial en un litro de agua). Con ayuda de columna de vidrio, se mezcló la sacarosa con el pellet hasta lograr una mezcla homogénea. Luego se procedió a realizar una segunda centrifugación a 1000g durante 2 minutos. Finalmente se vertió el sobrenadante sobre un tamiz de 37 µm debajo del grifo para “lavar” los huevos y retirar la sacarosa. El contenido del tamiz fue colocado en vasos de precipitado para posterior recuento sobre placa de conteo en microscopio óptico.

Población final de nematodo y factor de reproducción de acuerdo a Oostenbrink (1966).

La población final del nematodo se calculó mediante el número de huevos extraídos de la raíz y el número aproximado de vermiformes en el suelo. Para obtener este último valor, se extrapolan los resultados obtenidos de analizar 100 ml. de suelo al volumen total de la maceta. El Factor de reproducción se calculó por: población final x Población inicial⁻¹. La población inicial corresponde al número de huevos que se inocularon.

Determinación peso seco total

Se determinó el peso seco por planta (PST) mediante secado en estufa a 80°C hasta peso constante de la muestra.

Determinación del rendimiento

Se cosecharon, cuantificaron y pesaron los frutos de todas las plantas de los distintos tratamientos. Se determinó el n° de frutos final/planta y el promedio de gramos/fruto para cada tratamiento para observar el efecto del nematodo sobre el rendimiento y el efecto protector y estimulador de los microorganismos benéficos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El ensayo se realizó siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado, con ocho repeticiones. Los datos se analizaron por ANOVA y las medias se compararon usando LSD ($P < 0,05$) utilizando el programa estadístico SISVAR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de parámetros morfológicos

Altura y calibre

En la Tabla 1 pueden verse los promedios de las mediciones de altura y calibre para cada tratamiento en ausencia (SN) y presencia (CN) de *N. aberrans* realizados a los 90 días del trasplante. Dichos promedios no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con o sin infección con el nematodo. Coincidiendo con Chaves *et al.* (2011) que observaron que en genotipos de tomate clasificados como altamente susceptibles el fitoparásito no afectó la altura.

En presencia y ausencia de *N. aberrans* hay diferencias significativas en altura y calibre evaluando los distintos inóculos. En ambas situaciones, (CN) y (SN), los tratamientos con *Paecilomyces lilacinus* (PL) presentaron mayor altura que el resto de los inóculos ensayados. En cuanto al calibre, los tratamientos inoculados y no inoculados con nematodos con *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (PL BT) y *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL) fueron los que tuvieron mayores valores.

Liu *et al.* (2012) indicaron que los HMA y los PGPR pueden estimularse entre sí y tener una actividad sinérgica en la mejora del crecimiento de las plantas y reducir las enfermedades de las plantas. El crecimiento de plantas de tomate fue mayor al ser inoculadas con HMA y PGPR combinados que al hacerlo con inoculaciones individuales. Las inoculaciones individuales fueron consistentemente efectivas al aumentar el crecimiento de los brotes, pero no mejoró el tamaño de la raíz (Liu *et al.*, 2012).

Peso seco total

La presencia de *N. aberrans* (CN) afectó de manera negativa al peso seco total de las plantas pimiento, con diferencias significativas. Según lo expresado por Zamudio *et al.* (1987), las plantas infectadas con *N. aberrans*, presentan un menor peso del follaje verde y raíces, en comparación con plantas libres de nematodos. Lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación.

Así también se observó que el tratamiento con *N. aberrans* (CN) e inoculado con *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) obtuvo el mayor valor de peso seco total, el cual es comparable a los resultados arrojados por los tratamientos sin nematodos (SN). Lo visto no coincide con Hol & Cook (2005), que señalaron que la sola inoculación con *Bacillus sp.* no presentó efecto sobre las plantas tratadas.

En ausencia de nematodos (SN) la inoculación con la combinación de *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (PL BT) presentó mayor peso seco total comparado a los demás tratamientos. Similares resultados obtuvieron Valencia *et al.* (2014) al utilizar *Paecilomyces lilacinus* para el control de *Radopholus* sp. en banano, obteniendo los mayores valores de peso seco aéreo y de raíz siguiendo con el tratamiento en el que combinaron *P. lilacinus* con micorrizas y rizobacterias, al igual que plantas de lechuga inoculadas con *P. lilacinus* y *B. subtilis* frente al ataque de *Meloidogyne* spp. (Prakob *et al.*, 2009).

La inoculación multimicrobiana de hongos y bacterias promotores del crecimiento es una forma de proteger las plantas contra el estrés ya que pueden mejorar la nutrición y el crecimiento de las plantas, así como también reducir enfermedades y generalmente son más efectivos cuando se agregan juntos que en forma individual (Attia & Awad 2003; Akhtar & Siddiqui 2008; Siddiqui & Akhtar 2009; Correa, 2011).

Tabla 1: Efecto de la inoculación con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizopagus intraradices* (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y las combinaciones de los tres en la altura, calibre y peso seco total (PST) de las plantas de pimiento, en presencia (CN) y ausencia de *N. aberrans* (SN).

N.	Tratamiento	Altura (cm)	Calibre (cm)	PST (gr)
<i>aberrans</i>				
SN	Control	47,00 Ba	0,75 ABa	19,40 BCDA
	B1	44,60 Ba	0,76 ABa	17,20 CDA
	PL	54,50 Aa	0,72 ABa	20,20 BCa
	BT	47,75 Ba	0,79 Aa	18,80 CDA
	B1 PL	47,90 Ba	0,79 Aa	18,40 BCDA
	B1 BT	45,20 Ba	0,69 Ba	16,20 Da

	PL BT	47,50 Ba	0,80 Aa	26,00 Aa
	B1 BT PL	49,63Aba	0,84 Aa	21,60 Ba
CN	Control	51,50 Ba	0,77 Aba	13,40 Db
	B1	50,6 Ba	0,71 Aba	14,00 CDb
	PL	52,80ABa	0,79 Aba	16,40 ABb
	BT	49,60 Ba	0,80 Aa	18,50 Aa
	B1 PL	49,40 Ba	0,73 Aba	15,30 BCb
	B1 BT	48,30 Ba	0,71 Ba	12,75 CDb
	PL BT	53,70 Aa	0,76 Aa	16,60 ABb
	B1 BT PL	40,60 Ba	0,75 Aa	14,00 CDb

Medias seguidas por letras distintas indican diferencias significativas (LSD $p < 0.05$). Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas.

Evaluación de parámetros fisiológicos

Índice de verdor (IV)

Las determinaciones realizadas con SPAD para medir el índice de verdor de las hojas mostraron diferencias significativas (tabla 2) entre las plantas no inoculadas e inoculadas con *N. aberrans* (controles); presentado menores valores aquellas inoculadas (CN). A su vez mostró que la inoculación con *Paecilomyces lilacinus*, *Rhizophagus intraradices* B1 y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y las combinaciones entre estos aumentaron el índice de verdor en presencia de nematodos (CN). Comparando todos los tratamientos en presencia de *N. aberrans* (CN), el control da un valor más bajo que el resto.

Al comparar los mismos tratamientos inoculados y no inoculados con *N. aberrans* no se observaron diferencias significativas entre ellos.

En ausencia de *N. aberrans* (SN) el tratamiento con *Paecilomyces lilacinus* (PL) obtuvo el mayor índice de verdor comparado a los demás tratamientos. Como así, en presencia de éste (CN) los tratamientos con *Paecilomyces lilacinus* (PL) y *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (PL BT) intraradices B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL) obtuvieron valores superiores.

Díaz Franco *et al.* (2013) indicaron que la inoculación con *Rhizophagus intraradices* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) incrementó significativamente el valor SPAD, el cual se correlaciona con el contenido de clorofila y la absorción de nutrientes, particularmente N, en comparación con las plantas testigo (Sims & Gamon, 2002).

Conductancia estomática (CE)

La conductancia estomática de las plantas de pimiento evaluadas fue significativamente disminuida ante la presencia de *N. aberrans* (CN).

En la Tabla 2, puede verse como las inoculaciones con los distintos microorganismos benéficos y las combinaciones entre ellos en presencia de nematodos (CN) tendieron a que aumentara éste parámetro comparado con el control.

Los tratamientos con nematodos (CN) y *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* B1 (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT), *Rhizophagus intraradices* B1 y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (B1 BT) y *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL) obtuvieron mayores valores de este parámetro, los cuales fueron similares a los mismos tratamientos no inoculados con nematodos. Por otro lado, los tratamientos con *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (PL BT) y *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (B1 BT PL) obtuvieron menores valores en presencia de nematodos (CN).

En ausencia de *N. aberrans* (SN) la inoculación con *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (B1 BT PL) obtuvo un valor de conductancia estomática significativamente mayor al resto de los tratamientos.

La conductancia estomática es una estimación del intercambio gaseoso que ocurre en las hojas, es decir pérdida de agua por transpiración y consumo de CO₂ en el proceso de fotosíntesis. Una de las respuestas más rápidas y comunes de las plantas para limitar la pérdida de vapor de agua por transpiración es el cierre parcial o total de estomas. En consecuencia, el intercambio de gases que ocurre en la hoja se reduce; disminuye la pérdida de agua, pero también lo hace el flujo de CO₂ en dirección al mesófilo y por lo tanto la fotosíntesis (Bosco *et al.* 2009). Los resultados obtenidos indican que de *N. aberrans* provocó una reducción significativa en la conductancia estomática. Como se señaló es a través de la conductancia estomática, la transpiración de las plantas parasitadas es menor debido a una reducción en la apertura estomática. La transpiración es el principal mecanismo de disipación de energía calórica de las hojas por lo que si esta vía de regulación se encuentra afectada o disminuida la planta se ve obligada a emitir mayor energía por fluorescencia. Existe consenso en que la cuantificación de la fluorescencia puede ser considerada como un indicador de estrés en las plantas (Baker, 2008; Oukarroum *et al.* 2009).

Rendimiento máximo del fotosistema II (Fv/Fm)

La presencia de *N. aberrans* provocó una disminución significativa en el rendimiento máximo del fotosistema II. La inoculación con *Rhizophagus intraradices* B1 (B1), *Rhizophagus intraradices* y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL) y *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (B1 BT PL) evitaron que dicho parámetro sufra una disminución y por lo tanto no se altere el

fotosistema II. Tal efecto puede verse, en la Tabla 2, al comparar los mismos tratamientos inoculados (CN) y no inoculados (SN) con nematodos.

La inoculación de los distintos agentes de control de biológico no registró diferencias significativas en los tratamientos con ausencia del nematodo (SN). En presencia del nematodo (CN) hubo resultados variables, pero en todos los tratamientos el valor de Fv/Fm supero significativamente al tratamiento control. La inoculación con *Rhizophagus intraradices* y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL) presentó un rendimiento máximo significativamente superior al de los demás.

El coeficiente Fv/Fm puede tomar valores entre 0 y 0,85 y connota una relación directa con el porcentaje de centros funcionales del fotosistema II, es decir, que una disminución del mismo en general indica daño y pérdida de función a nivel del aparato fotosintético (alteración en la capacidad para realizar la fotosíntesis) (Tambusi & Graciano, 2010).

Peña- Rojas *et al.* (2018) observaron que plantas sometidas a estrés hídrico experimentaron un descenso en sus parámetros hídricos internos en respuesta a la menor disponibilidad de agua en el perfil de suelo, lo cual repercutió en un detrimento general de la actividad fisiológica y fotosintética. Debido a potenciales hídricos bajos la fotosíntesis puede ser alterada por efectos no estomáticos, principalmente por una reducción en la actividad de los fotosistemas II (PSII) y en las reacciones de transferencia de electrones entre los fotosistemas.

La inoculación con micorrizas favorece el crecimiento de las plantas, pues incrementa la provisión de recursos en especial fósforo (P), lo que se refleja en una mayor eficiencia fotosintética y una menor incidencia de organismos patógenos (Safir, 1990; Kyde & Gould, 2000).

Tasa de transferencia de electrones (ETR)

De igual forma que ocurrió con el rendimiento máximo del fotosistema II (Fv/Fm), la presencia del *N. aberrans* (CN) provocó una reducción significativa de la tasa de transferencia de electrones.

Comparando los mismos tratamientos con los agentes de control biológico, solos y combinados, inoculados (CN) y no inoculados (SN) con nematodos, se puede ver que los no inoculados (SN) obtuvieron mayores tasas de transferencia de electrones ($p < 0,05$); el tratamiento con *Paecilomyces lilacinus* (PL) no presentó diferencias significativas CN y SN.

En ausencia de *N. aberrans* (SN) no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. En presencia de nematodos (CN) los tratamientos con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL), *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (PL BT) y *Rhizophagus intraradices*, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (B1 BT PL) obtuvieron valores significativamente más altos con respecto al resto.

Tabla 2: Índice de verdor (IV), conductancia estomática (CE), transferencia de electrones (ETR), rendimiento máximo del fotosistema II (Fv/Fm) de plantas de pimiento inoculadas y no inoculadas con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y las combinaciones de los tres en presencia (CN) y ausencia de *N. aberrans* (SN).

<i>N. aberrans</i>	Tratamiento	IV	CE (mol m ⁻² s ⁻¹)	Fv/Fm	ETR
SN	Control	46,48 ABa	105,63 Ba	0,757 Aa	0,1914 Aa
	B1	45,40 ABa	91,53 BCa	0,701 Aa	0,1716 Aa
	PL	49,50 Aa	87,35 BCa	0,748 Aa	0,1918 Aa
	BT	44,88 Ba	71,00 Ca	0,723 Aa	0,1378 Aa
	B1 PL	47,66 ABa	62,75 BCa	0,742 Aa	0,1862 Aa

	B1 BT	46,14 ABa	91,60 Cb	0,730 Aa	0,1878 Aa
	PL BT	44,60 Ba	116,55 ABa	0,748 Aa	0,1628 Aa
	B1 BT PL	46,72 ABa	144,20 Aa	0,716 Aa	0,1910 Aa
CN	Control	38,10 Cb	29,90 Eb	0,521 Db	0,0590 Cb
	B1	45,45 ABa	72,55 ABCDa	0,646 BCa	0,0670 BCb
	PL	47,90 Aa	63,35 CDEa	0,659 ABb	0,0855 Aa
	BT	42,15 BCa	52,90 DEa	0,588 Cb	0,0677 BCb
	B1 PL	47,28 Aa	103,70 Aa	0,714 Aa	0,0852 Ab
	B1 BT	42,63 Ba	90,25 ABCa	0,625 BCb	0,0692 BCb
	PL BT	48,24 Aa	66,85 BCDb	0,654 Bb	0,1178 Ab
	B1 BT PL	45,48 ABa	99,85 ABb	0,681 Aba	0,0858 Ab

Medias seguidas por letras distintas indican diferencias significativas (LSD $p < 0.05$). Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas.

Conductividad relativa de las membranas celulares de hojas y raíces

La conductividad relativa (CR) en un tejido estresado ante la presencia de *N. aberrans* fue mayor que la proveniente de un tejido no estresado. La permeabilidad selectiva de las membranas celulares puede verse afectada por diversos factores ambientales y situaciones de estrés (estrés hídrico, daño mecánico a las raíces). Estas situaciones alteran la integridad celular y la capacidad de retención de sustancias intracelulares (Beltrano *et al.* 2013).

La conductividad de las membranas celulares de hojas y raíces en presencia de nematodos (CN) disminuyó con inoculación de *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* y *Paecilomyces lilacinus*, solos o combinados.

La conductividad en las hojas (figura 4), presentó menor valor con respecto a los demás tratamientos en las plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL) en presencia de nematodos (CN). El establecimiento de la simbiosis con micorrizas genera cambios cualitativos y cuantitativos en los exudados de las raíces. Esto da lugar a la aparición de sustancias que ejercen un efecto directo sobre los microorganismos perjudiciales o bien, alteran la señalización planta / patógeno, disminuyendo el ingreso de juveniles a la raíz (Sikora & Fernández, 2005; Vos *et al.* 2012). En ausencia de nematodos (SN) la conductividad relativa de las membranas fue baja y no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Comparando los mismos tratamientos inoculados (CN) y no inoculados (SN) con nematodos, aquellos inoculados (CN) presentaron un aumento significativo de la conductividad relativa.

En las raíces, figura 5, en ausencia de nematodos (SN) la conductividad relativa disminuyó significativamente cuando se inoculo con *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (PL BT). En presencia de nematodos (CN) el valor más alto correspondió al tratamiento control, la combinación de *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (B1 BT PL) disminuyó dicho valor.

En concordancia con Kaya *et al.* (2009), la simbiosis con hongos micorrícicos ejerció un efecto protector de la integridad de las membranas celulares de raíces y hojas.

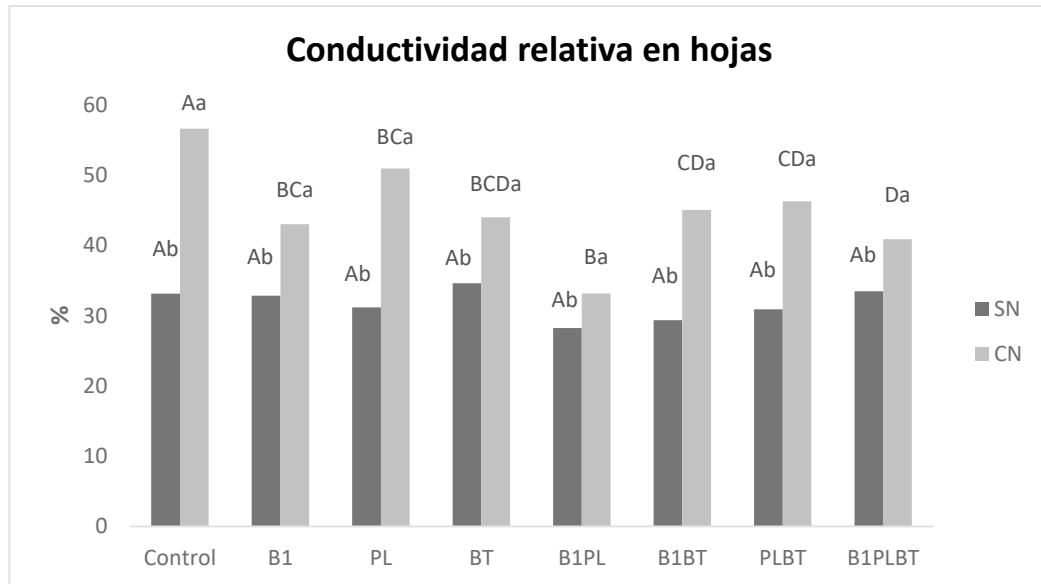


Figura 4: Efecto de la inoculación con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* B1 (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y las combinaciones de los tres en la conductividad relativa de las membranas celulares de las hojas de las plantas en presencia (CN) y ausencia de *N. aberrans* (SN). Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas indican diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas.

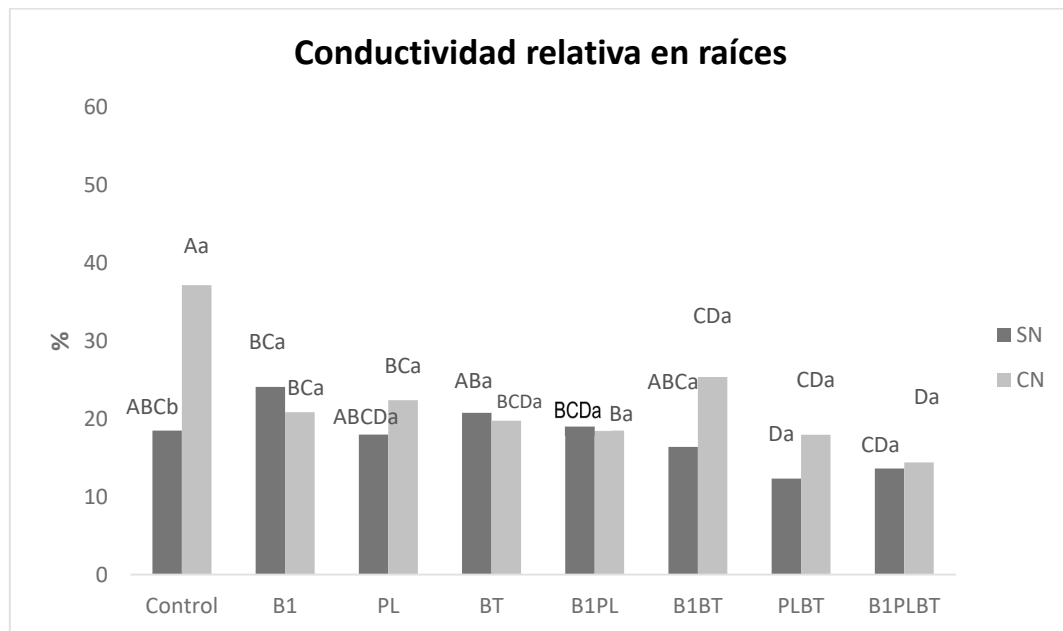


Figura 5: Efecto de la inoculación con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* B1 (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y las combinaciones de los tres en la conductividad relativa de las membranas celulares de las raíces de las plantas en presencia (CN) y ausencia de *N. aberrans* (SN). Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas indican diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas.

Contenido de proteínas solubles en hojas y raíz

La presencia de *N. aberrans* provocó una disminución significativa del contenido de proteínas solubles en las hojas de las plantas de pimiento. Dicho efecto puede verse en la figura 6, donde los valores registrados son los contenidos de proteínas solubles para cada tratamiento expresados en μg proteínas solubles por mg de peso fresco. Esto resulta previsible, ya que una situación de estrés biótico o abiótico activa una cascada de eventos tales como una reducción en el crecimiento celular, inhibición en la síntesis proteica y la represión y/o activación de la actividad enzimática (Marmioli *et al.* 1993). El contenido de proteínas foliares presentes en las plantas, se encuentra en estrecha relación con el nivel nutricional de las mismas, esto es debido a que una de las funciones fundamentales de los microorganismos inoculados, es estimular el desarrollo radical de las plantas, lo que posibilita una mayor exploración del sistema radical para una mejor absorción de agua y nutrientes (Alfonso & Leyva Galán, 2006).

En presencia de nematodos (CN) la inoculación con *Paecilomyces lilacinus* (PL) y la combinación *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL) evitaron la disminución en el contenido de proteínas.

En ausencia del nematodo (SN) el contenido de proteínas solubles en las hojas tendió a aumentar con la inoculación de los microorganismos benéficos. El tratamiento con *Rhizophagus intraradices* B1 y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (B1 BT) sin nematodos (SN) presentó el mayor contenido. De Andrade *et al.* (2008), reportaron mayores niveles de proteínas foliares en las plantas micorrizadas. El contenido de proteínas en el tejido aéreo refleja lo observado en otros parámetros de crecimiento. Las plantas control se ven afectadas por el nematodo y las plantas micorrizadas en mayor o menor medida consiguen atenuar el impacto negativo del parasitismo (Krajinski *et al.* 2000).

En las raíces, el contenido de proteínas solubles en presencia de *N. aberrans* aumentó significativamente en el tratamiento control tal como puede verse en la figura 7. Este aumento en la concentración de proteínas en plantas atacadas por nematodos, coincide con lo expuesto por Taylor & Sasser (1983), que afirman que las raíces infectadas presentan un metabolismo intermediario más acelerado en las agallas, especialmente en los sistemas de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, por lo que hay mayor producción de proteínas y menor transporte de sustancias al resto de la planta. No se registraron diferencias significativas entre los tratamientos con nematodos (CN) inoculados con *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus*, solos o combinados.

En ausencia del nematodo (SN) el mayor contenido se registró en el tratamiento que combina a los tres agentes de control biológico (B1 BT PL).

Comparando los mismos tratamientos inoculados y no inoculados con nematodos se observaron resultados variables. Los tratamientos con *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL), *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (B1 BT PL) en ausencia de nematodos (SN) superaron el contenido de proteínas respecto de los que contenían nematodos (CN); mientras que, en presencia de nematodos la inoculación con *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y *Paecilomyces lilacinus* (PL) presentaron un contenido mayor y, los restantes no presentaron diferencias significativas entre ellos.

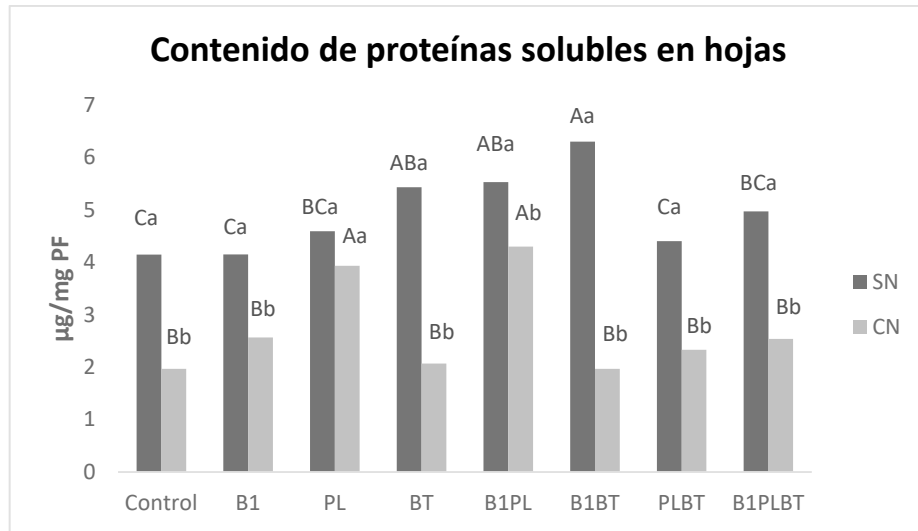


Figura 6: Efecto de la inoculación con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* B1 (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y las combinaciones de los tres en el contenido de proteínas solubles en las hojas, en presencia (CN) y ausencia de *N. aberrans* (SN). Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas indican diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas.

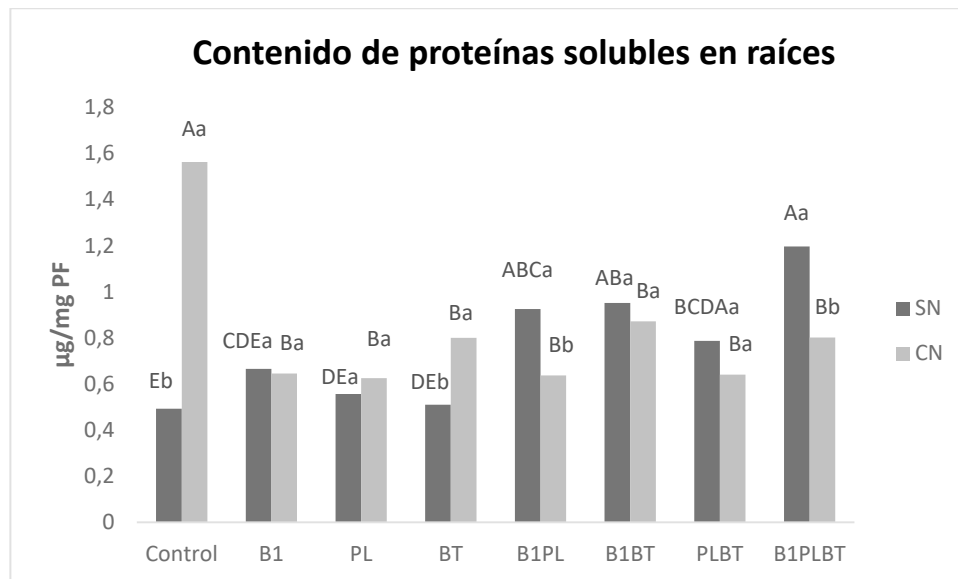


Figura 7: Efecto de la inoculación con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* B1 (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y las combinaciones de los tres en el contenido de proteínas en las raíces en presencia (CN) y ausencia de *N. aberrans* (SN). Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas indican diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas.

Contenido de clorofila y carotenos

La presencia de *N. aberrans* disminuyó significativamente el contenido de clorofila (figura 8) y carotenos (figura 9) en las hojas de pimiento. Lo que coincide con Zarco-Tejada *et al.* (2004) que sostienen que en plantas sanas con alta capacidad de crecimiento, se espera que contengan concentraciones altas de clorofila, en relación con plantas poco saludables.

La inoculación con *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus*, solos o combinados, en presencia de *N. aberrans* tendió a aumentar el contenido de clorofila. Comparando los mismos tratamientos inoculados y no inoculados con nematodos se observó que, el tratamiento con *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL) con presencia nematodo (CN) tuvo un aumento significativo en el contenido de clorofila del mismo comparado al sin nematodos (SN). En el resto de los tratamientos la tendencia en los tratamientos con inoculantes demostró una leve disminución de la clorofila respecto de los tratamientos sin inocular. Siendo el tratamiento con *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT), el que mayor caída presentó. Los tratamientos con *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (B1 BT PL), inoculados y no inoculados con el nematodo, presentaron en sus hojas los contenidos más elevados de clorofila.

En presencia de nematodos (CN) la inoculación con *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus*, solos o combinados, provoca un aumento del contenido de carotenos respecto al control (figura 9). Los tratamientos con *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y la combinación de *Rhizophagus intraradices* B1 y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (B1 BT) mostraron una significativa reducción del contenido de carotenos en las plantas inoculadas. En

ausencia de nematodos (SN) el contenido de carotenos es mayor y no mostró grandes diferencias con la inoculación de los agentes de control biológico, solos o combinados; excepto cuando se utilizó a *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) que como puede verse su contenido aumento significativamente.

Los resultados de este trabajo coinciden con estudios que han reportado también que la sola inoculación con HMA en maíz (*Zea mays*) y pimiento (*Capsicum annuum*) incrementó los pigmentos fotosintéticos comparado con testigos no inoculados (Sheng *et al.* 2008; Díaz Franco *et al.* 2013), lo cual puede deberse a que con la actividad simbiótica la planta presenta un mejor aprovechamiento de los nutrientes poco móviles o inmóviles del suelo (Clark *et al.* 1999; Allen *et al.* 2001).

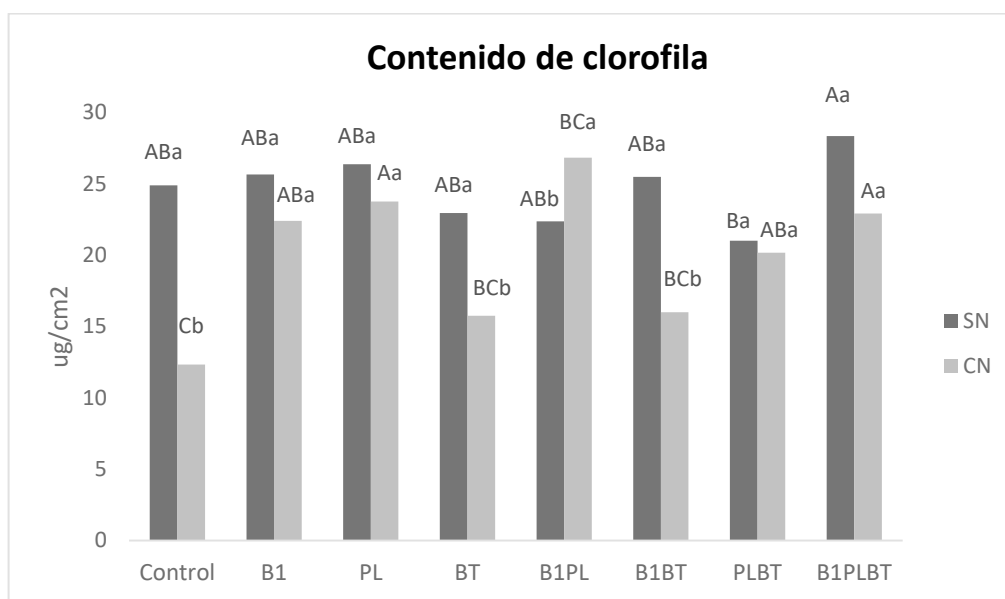


Figura 8: Efecto de la inoculación con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y las combinaciones de los tres en el contenido de clorofila en presencia (CN) y ausencia de *N. aberrans* (SN). Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas indican diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas.

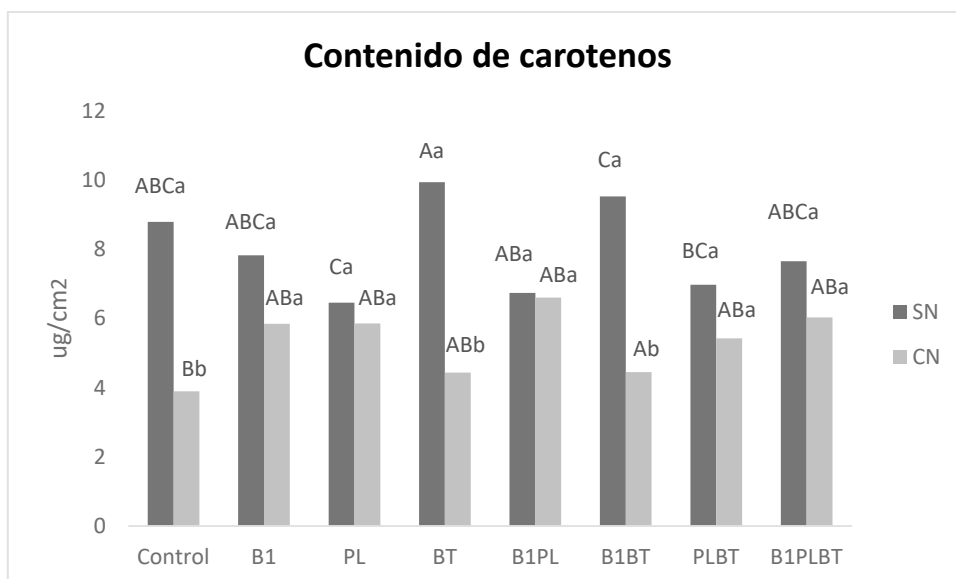


Figura 9: Efecto de la inoculación con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizopagus intraradices* (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y las combinaciones de los tres en el contenido de carotenos en presencia (CN) y ausencia de *N. aberrans* (SN). Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas indican diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas.

Determinación del % de micorrización, % vesículas, % hifas y % arbúsculos

La presencia de *N. aberrans* no produjo diferencias significativas en el porcentaje de micorrización (% M) entre los tratamientos tal como puede verse en la tabla 3. Lo que coincide con lo encontrado por Akhtar & Siddqui (2007) que la infestación de nematodos no afectó la colonización de micorrizas en raíces de garbanzo. Las infecciones radicales por nematodos patógenos son generalmente menores sobre plantas micorrizadas que sobre plantas no micorrizadas, pero la respuesta puede variar (Paulitz & Linderman, 1991). A su vez no se observó que *B. thuringiensis* y *P. lilacinus* hayan afectado la micorrización al igual que Al-Raddad (1995) donde la colonización micorrícica no se vió afectada por la inoculación de raíces con *P. lilacinus*. También se evidenció que las micorrizas no son afectadas por las PGPR (Liu *et al.*, 2012; Flor-Peregrin *et al.*, 2012).

En ausencia del nematodo (SN) el tratamiento inoculado con *Rhizopagus intraradices* B1 (B1) presentó un valor significativamente mayor que los demás y en

presencia (CN), el mayor valor lo obtuvo la inoculación que combinó *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL)

En ausencia del nematodo (SN) el porcentaje de vesículas (% V), hifas (% H) y arbúsculos (% A) fue significativamente mayor en el tratamiento inoculado solo con *Rhizophagus intraradices* B1 (B1) comparado con los demás tratamientos que combinaban microorganismos.

El porcentaje de vesículas (% V) en los tratamientos inoculados con *Rhizophagus intraradices* B1 (B1), inoculado y no inoculado con *N. aberrans* obtuvieron los mayores valores. Los tratamientos con presencia del nematodo (CN) e inoculados *Rhizophagus intraradices* B1 y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (B1 BT) y *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL) superaron los porcentajes de los mismos tratamientos en ausencia del nematodo (SN). El tratamiento que combina los tres agentes de control biológico, *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (B1 BT PL), en presencia del nematodo (CN) presentó un porcentaje de vesículas significativamente menor comparado con los demás tratamientos.

El porcentaje de hifas (% H) no mostró diferencias significativas en los distintos tratamientos con presencia de *N. aberrans* (CN). El tratamiento inoculado con *Rhizophagus intraradices* B1 y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (B1 BT) presentó mayor porcentaje respecto del mismo en ausencia del nematodo (SN).

El porcentaje de arbúsculos (% A) no se vio modificado ante la presencia de *N. aberrans* a excepción del tratamiento que combina los tres microorganismos que mostró una disminución significativa del mismo. Botello *et al.*, (1999) indicaron que el porcentaje de arbúsculos disminuyó ante la presencia de nematodos, en cambio Bernardo *et al.* (2020) observaron un leve aumento de arbúsculos en presencia de *N. aberrans*. Esta respuesta es importante porque la presencia de arbúsculos confirma la eficacia de la

micorrización. Los tratamientos con *Rhizophagus intraradices* B1 (B1) presentaron un incremento significativo de dicho porcentaje.

Tabla 3: Porcentaje de micorrización (% M), porcentaje de vesículas (% V), porcentaje de arbuscúlos (% A) y porcentaje de hifas (% H) de plantas de pimiento inoculadas con *Rhizophagus intraradices* (B1) y su combinación con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y ambos microorganismos en presencia (CN) y ausencia de *N. aberrans* (SN).

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

Medias seguidas por letras distintas indican diferencias significativas (LSD $p < 0.05$). Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas indican diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas.

Determinación de huevos totales, huevos por gramo de raíz y factor de reproducción de Oostenbrick.

Las plantas inoculadas con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* B1 (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT), tanto solos o combinados entre sí, presentaron en el recuento al microscopio, una menor cantidad huevos totales de *N. aberrans* en sus raíces, con diferencias significativas respecto al control y menor número

de huevos de por gramos de raíz; sin evidenciarse diferencias entre los distintos tratamientos (tabla 4).

Diferentes autores reportaron resultados similares en donde se utilizaron *B. thuringiensis*, *P. lilacinus* y micorrizas de manera individual para control de *Meloidogyne* sp. y de *N. aberrans* (Zuckerman *et al.* 1993; Gortari & Hours, 2016; Bernardo, *et al.* 2020).

El factor de reproducción de *N. aberrans* de Oostenbrick (Fr) ante la presencia de los agentes de control biológico también se redujo de manera significativa. La reproducción del nematodo es afectada por diversos factores, tales como temperatura, disponibilidad de alimento, prácticas agrícolas, entre otros (Norton & Norton, 1978), por lo que los nematodos de las plantas control (sin bioinsumos), al no tener algún factor crítico limitante, presentaron las máximas tasas de multiplicación.

La inoculación combinada con *Rhizophagus intraradices* B1 y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (B1 BT) presentó el valor más bajo de factor de reproducción.

La relación entre los HMA y géneros de bacterias entomopatógenas tienen un efecto beneficioso sobre la tolerancia o resistencia de las plantas a los patógenos como nematodos parásitos de las plantas (Akhtar & Siddqui, 2008). A su vez se ha reportado que la combinación de *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus sp.* ha logrado no sólo bajar la población y tasa de reproducción de *Meloidogyne sp.* sino también mejorar parámetros de crecimiento (Prakob *et al.*, 2009; Khalil *et al.*, 2012).

Hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) tienen potencial para controlar las enfermedades transmitidas por el suelo, incluidos los nematodos parásitos de las plantas tanto en forma individual como combinados (Sharma & Sharma, 2017).

Los mecanismos de supresión de nematodos por las micorrizas en las raíces parece estar relacionado con cambios fisiológicos en las raíces que afectan la fuente de

alimento o la alimentación de los nematodos (condición desfavorable para su desarrollo) más una competencia directa por el espacio y liberación de exudados (Shouteden *et al.*, 2015). De la Peña *et al.* (2006) consideraron que la supresión de los nematodos por HMA no ocurre a través de una respuesta sistémica de la planta sino a través de mecanismos locales, aunque hay información contradictoria al respecto.

La densidad de población de nematodos finales y la gravedad de la enfermedad (número de agallas) se redujeron hasta un 40 % en tratamientos con HMA. Por otro lado, no se observó un efecto sobre la gravedad de la enfermedad en las plantas tratadas únicamente con *Bacillus megaterium*. En la mayoría de los cultivares de tomate, ningún efecto sinérgico se observó con el uso combinado de HMA y *Bacillus megaterium*. (Hol & Cook, 2005). Sin embargo, en *Capsicum annuum* cv. Perico se encontró que la disminución en la reproducción de nematodos era mayor cuando los HMA y *Bacillus megaterium* se usaron juntos en comparación con las plantas inoculadas con solo uno de ellos. Este hallazgo es similar a la interacción entre *Glomus sp* y *Bacillus sp*. reportado por Akhtar & Siddqui (2007) para *M. incognita* en garbanzo.

Ambo *et al.* (2010) observaron que la aplicación de vermicompost + *Glomus aggregatum* + *Bacillus coagulans* aumentó los parámetros de crecimiento de las plantas y produjo una reducción de la tasa de reproducción de nematodos, número de agallas y masas de huevo sobre tomate cv Pusa Ruby en suelos franco-arenosos.

La colonización de raíces por HMA y PGPR, individualmente o en combinación, tuvieron un efecto negativo sobre el desarrollo de la población de *Meloidogyne incognita*. Esto puede ser debido a la fuerte inducción sistémica de resistencia de las plantas a los nematodos (Elsen *et al.* 2008). HMA y PGPR pueden hacer esto a través de su propio metabolismo (como solubilización de fosfato, producción de hormonas, N₂-fijación, etc.),

afectando directamente al metabolismo de la planta (por ejemplo, mejorar la absorción de agua y minerales, mejorar la raíz desarrollo, mejorar la actividad de las enzimas vegetales, etc.), o afectando a los exudados liberados que atraen microorganismos beneficiosos para ayudar en el control de patógenos (Bashan & Holguin 1998; Gryndler 2000; Linderman 1988; Shreenivasa *et al.* 2007).

Según Bernal *et al.* (2002), *Paecilomyces lilacinus* regula las poblaciones de *Meloidogyne spp* a niveles no dañinos al cultivo. El control biológico con *G. mosseae* y *P. lilacinus* juntos o por separado inhibió la infección de la raíz con *M. javanica* (Al-Raddad, 1995).

Tabla 4: Huevos totales, huevos por gramo de raíz y factor de reproducción (Fr) de los tratamientos inoculados con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y las combinaciones de los tres en presencia de *N. aberrans*.

Tratamiento	Huevos totales	Huevos.gr1 raíz	Fr
Control	87.833 A	1209,80 A	17,57 A
B1	37.833 B	638,53 B	7,57 B
PL	47.200 B	538,61 B	9,44 B
BT	28.466 B	359,42 B	5,69 BC
B1 PL	26.766 B	355,69 B	5,35 BC
B1 BT	18.133 B	368,18 B	3,62 C
PL BT	37.366 B	454,60 B	7,47 B
B1 BT PL	32.000 B	433,60 B	6,4 B

Medias seguidas por letras distintas indican diferencias significativas (LSD $p < 0.05$). Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos en plantas inoculadas con *N. aberrans*.

La simbiosis con micorrizas permite una mayor absorción de nutrientes como P, N, K, Ca, Mg, Fe y Mn lo que resulta en plantas más vigorosas y más tolerantes a patógenos (Gianinazzi *et al.*, 2010). También tiene la capacidad de producir cambios en el sistema radicular (foto 9) después de la colonización, el hongo micorrícico provoca cambios morfológicos y fisiológicos en la raíz, lo que dificulta la entrada de otros microorganismos como en el caso de nematodos endoparásitos (Pozo *et al.*, 2013). A su vez, diferentes autores concluyen que *P. lilacinum* es un hongo con una importante actividad ovicida y que bajo ciertas circunstancias también puede parasitar otras etapas del ciclo de vida del nematodo (Núñez-Camargo *et al.* 2012, Pau *et al.* 2012, Vergara Alzate *et al.* 2012). En cuanto *B. thuringiensis*, Mohammed *et al.* (2008) evaluaron las toxinas de esta bacteria sobre *Meloidogyne incognita* consiguiendo una reducción de 76 y 85% de masas de huevos y huevos respectivamente.



Foto 9: Agallas de *N. aberrans* en raíces de pimiento (fuente propia 2020).

Las plantas infestadas con *N. aberrans* presentaron raíces más oscuras y de menor tamaño. Estos resultados pueden ser explicados por la numerosa cantidad de

agallas encontradas en las raíces producto de la hiperplasia e hipertrofia de las células, como consecuencia del parasitismo de *Nacobbus aberrans* (Shurtleff & Averre, 2000).

La inoculación con microorganismos benéficos en ausencia de nematodos no presentó grandes diferencias entre tratamientos; a excepción de B1, pues es sabido que la proliferación de hifas cumpliendo funciones de absorción, hizo que las plantas destinen menos recursos al crecimiento radicular (Pereira *et al.*, 2001). Mientras que, en presencia de nematodos los tratamientos inoculados con microorganismos benéficos mejoraron su situación. En plantas infestadas con *Phytophthora cactorum*, la inoculación con *Glomus mosseae* y *Bacillus subtilis* evitó la necrosis de las raíces (Vestberg *et al.* 2004). Es de destacar como el tratamiento que combina los 3 microorganismos (B1 BT PL) presentó mayor tamaño de raíces comparado a los demás tratamientos en ausencia y presencia de *N. aberrans* (foto 10)



Foto 10: **A-** Raíces del tratamiento control (C) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **B-** Raíces del tratamiento inoculado con *Rhizophagus intraradices* (B1) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **C-** Raíces del tratamiento inoculado con *Paecilomyces lilacinus* (PL) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **D-** Raíces del tratamiento inoculado con *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **E-** Raíces del tratamiento inoculado con *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **F-** Raíces del tratamiento inoculado con *Rhizophagus intraradices* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (B1 BT) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **G-** Raíces del tratamiento inoculado con *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (PL BT) en ausencia y presencia de *N. aberrans*. **H-** Raíces del tratamiento inoculado con *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (B1 BT PL) en ausencia y presencia de *N. aberrans* (fuente propia 2020).

Determinación del rendimiento

En la figura 10 pueden verse los promedios de rendimiento expresando en gr por fruto y número de frutos para cada tratamiento en ausencia (SN) y presencia (CN) de *N.*

aberrans; los cuales no presentan diferencias significativas entre sí. Este efecto puede deberse a que es un ensayo en maceta.

La inoculación con *Paecilomyces lilacinus*, *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y las combinaciones entre estos microorganismos no modificaron los parámetros medidos de manera significativa. Sin embargo, los tratamientos (B1 PL) en presencia de nematodos (CN) tendieron a aumentar los gramos por fruto ante (CN).

No se hallaron diferencias significativas en el peso de los frutos entre los tratamientos con y sin nematodos, mientras que la mayor cantidad de frutos se obtuvieron en los tratamientos con nematodos. Cristóbal *et al.* (2001) indican que los frutos de las plantas de tomate y pimiento infectadas con nematodos, son pequeños, pierden firmeza, disminuye su vida útil, y consecuentemente no tienen aceptación en el mercado.

En presencia de nematodos (CN) la mayor cantidad de frutos la obtuvieron los tratamientos con *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (PL BT) y *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (B1 BT PL). Mientras que, en ausencia (SN) el tratamiento inoculado con *Rhizophagus intraradices* B1 (B1) obtuvo el mayor número de frutos.

Tabla 5: Efecto de la inoculación con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) y la combinación de los tres microorganismos en el rendimiento en presencia (CN) y ausencia de *N. aberrans* (SN).

<i>N. aberrans</i>	Tratamiento	N° frutos totales	Gr/fruto
SN	Control	11 Ba	65,00 Ba
	B1	14 Aa	59,93 Ba
	PL	9 Cb	61,64 Ba

	BT	12 Aba	55,93 Ba
	B1 PL	12 Aba	58,14 Aba
	B1 BT	10 Ba	64,29 Aba
	PL BT	12 ABb	68,00 Aa
	B1BTPL	11 Bb	68,00 Aa
CN	Control	10 BCa	55,33 Aba
	B1	8 Cb	50,40 Ba
	PL	12 Ba	58,14 Aba
	BT	10 BCb	63,93 Ba
	B1 PL	12 Ba	60,86 Aba
	B1 BT	9 Ca	53,33 Aba
	PL BT	17 Aa	54,14 Aba
	B1BTPL	16 Aa	54,50 Aba

Medias seguidas por letras distintas indican diferencias significativas (LSD $p < 0.05$). Letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos. Letras minúsculas indican diferencias entre plantas inoculadas con *N. aberrans* y no inoculadas.

CONCLUSIONES

- En coincidencia con la hipótesis, la asociación con hongos micorrícicos arbusculares, hongos nematófagos y algunos géneros de bacterias mitigaron los daños causados por *N. aberrans* sobre las plantas de pimiento, creciendo en condiciones experimentales.
- Los HMA y los promotores del crecimiento vegetal (PGPR) mostraron la capacidad de potenciarse entre sí y tener una actividad aditiva en la mejora del crecimiento de las plantas sometidas a este estrés biótico.
- Se observó que las plantas infectadas con *N. aberrans* (CN) presentaron menor peso seco total que las plantas sin nematodo. El tratamiento con nematodo e inoculado con *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT) obtuvo el mayor valor de peso seco total.

- En presencia de *N. aberrans* (CN) los tratamientos con *Paecilomyces lilacinus* (PL) y *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (PL BT) y *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL) obtuvieron valores superiores en el índice de verdor, respecto al control sin inoculación con microorganismos benéficos.

- Los tratamientos con nematodos (CN) e inoculados con los diferentes ACB obtuvieron mayores valores conductancia estomática respecto al control

- La inoculación con los distintos agentes de control biológico evitó una disminución significativa en el rendimiento máximo del fotosistema II.

- En cuanto a la tasa de transferencia de electrones, en presencia de nematodos (CN) los tratamientos con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL), *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (PL BT) y *Rhizophagus intraradices*, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (B1 BT PL) obtuvieron valores significativamente mayores

- La conductividad de las membranas celulares de hojas y raíces aumentó en presencia de nematodos (CN) y, a su vez, disminuyó con la inoculación de *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus*, solos o combinados, lo que indica que estos ACB disminuyen el daño en las membranas celulares.

- En presencia de nematodos (CN) la inoculación con *Paecilomyces lilacinus* (PL) y la combinación *Rhizophagus intraradices* B1 y *Paecilomyces lilacinus* (B1 PL) evitaron la disminución del contenido de proteínas solubles en raíz y hojas.

- La inoculación con *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus*, solos o combinados, en presencia de *N. aberrans* tendió a aumentar el contenido de clorofila y de carotenos.
- Se encontraron respuestas positivas en el % de micorrización, % vesículas, % hifas y % arbusculos en la mayoría de los tratamientos donde se combinaron los diferentes microorganismos.
- Las plantas inoculadas con *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Rhizophagus intraradices* B1 (B1), *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (BT), tanto solos o combinados entre sí, presentaron menor cantidad huevos totales de *N. aberrans* en sus raíces, evidenciando el efecto benéfico de estos microorganismos.
- La densidad de población de nematodos finales y la gravedad de la enfermedad (número de agallas) se redujeron hasta un 40 % en tratamientos con HMA.
- En presencia de nematodos los tratamientos inoculados con microorganismos benéficos mejoraron el desarrollo radical.
- Los tratamientos (B1 PL) en presencia de nematodos (CN) tendieron a aumentar el tamaño del fruto ante (CN) mientras que la mayor cantidad de frutos la obtuvieron los tratamientos con *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (PL BT) y *Rhizophagus intraradices* B1, *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki y *Paecilomyces lilacinus* (B1 BT PL).

CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la importancia de la inoculación de microorganismos benéficos como hongos nematófagos, hongos micorrícicos arbusculares y bacterias entomopatógenas para lograr una disminución de

la población *N. aberrans* y, por lo tanto, mitigar los efectos adversos que causa este nematodo en las plantas de pimiento, mejorando así su crecimiento y rendimiento. El productor puede aprovechar las ventajas que ofrecen estos microorganismos mediante técnicas sencillas utilizando inoculantes de venta comercial, que pueden ser aplicados directamente al sustrato o junto con el agua de riego. Al incorporar esta práctica, el productor fija como objetivo no solo el beneficio productivo sino también el uso sustentable de los recursos del agroecosistema.

Tanto esta experiencia como otras demostraron que el uso de microorganismos benéficos reduce la infestación por *N. aberrans* y mejora el crecimiento de las plantas; siendo eficiente su aplicación como agentes de control biológico contra nematodos y a su vez como biofertilizantes. La selección de la mejor combinación de microorganismos para usar en inoculaciones duales o trinoculaciones requiere más investigación, tanto a nivel experimental como a campo, dado que deben tenerse en cuenta diversos factores como la planta hospedante, el patógeno, las condiciones ecológicas, el método de inoculación y la duración del cultivo, entre otras.

BIBLIOGRAFIA

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

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

Akhtar, M. S., & Siddiqui, Z. A. (2007). Biocontrol of a chickpea root-rot disease complex with *Glomus intraradices*, *Pseudomonas putida* y *Paenibacillus polymyxa*. *Australasian Plant Pathology*, 36: 175-180.

Akhtar, M. S., & Siddiqui, Z. A. (2008). Biocontrol of a root-rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices*, *Rhizobium* sp. and *Pseudomonas straita*. *Crop Protection*, 27: 410-417.

Alcozer, H., Murguía-Cordova, J., & Murguía, C. (2006). Efectos de solarización y enmiendas orgánicas contra el nematodo del nudo *Meloidogyne incognita* bajo condiciones de vivero. *Universalía*, 11 (1): 13-22.

Alfonso, E. T., & Galán, A. L. (2006). Evaluación agrobiológica de la coinoculación micorrizas-rizobacterias en tomate. *Agronomía Costarricense*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43630106>> ISSN 0377-9424.

Allen, B. L., Jolley, V. D., Robbins, C. W., & Freeborne, L. L. (2001). Fallow versus wheat cropping of unamended and manureamended soils related to mycorrhizal colonization, yield and plant nutrition of dry bean and sweet corn. *Journal of Plant Nutrition*, 24(6), 921-943.

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

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

Ambo, P. B. N., Ethiopia, E. A., Serfoji, P., Rajeshkumar, S., & Selvaraj, T. (2010). Management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato cv Pusa Ruby. by using vermicompost, AM fungus, *Glomus aggregatum* and mycorrhiza helper bacterium, *Bacillus coagulans*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 6, 37-45.

Attia, M., & Awad, N. M. (2003). Assessment the impact of certain growth promoting rhizobacteria strains on symbiotic effective-ness of arbuscular mycorrhizal fungi. *Egyptian Journal of Microbiology*, 38, 75-88.

Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89-113.

Barea, J. M. (2000). Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. In *Biological resource management connecting Science and Policy* (pp. 81-92). Springer, Berlin, Heidelberg.

Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology & Biochemistry*, 30(8-9), 1225-1228.

Bécard, G., & Pfeffer, P. E. (1993). Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma*, 174: 62-68.

Bernal, B., Fernandez, E., & Vazquez, L. (2002). Manejo de plagas en la agricultura orgánica (en línea). La Habana, Cuba. Consultado el 20 feb. 2004. Disponible en: <http://www.aguascalientes.gob.mx/agro/produce/AGRIURBA.htm>.

Bello, A., López-Pérez, J. A., & Díaz Viruliche, L. (2000). Biofumigación y solarización como alternativas al bromuro de metilo. Dpto Agroecología, CCMA, CSIC. Serrano 115 dpdo 28006.

Beltrano, J., Ruscitti, M., Arango, C., & Ronco, M. (2013). Changes in the accumulation of shikimic acid in mycorrhized *Capsicum annuum* L. grown with application of glyphosate and phosphorus. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(2), 125-136.

Bernardo, V. F., Garita, S. A., Arango, M. C., Ripodas, J. I., Saparrat, M. C. N., & Ruscitti, M. F. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi against the false root-knot nematode activity in *Capsicum annuum*: physiological responses in plants. *Biocontrol Science and Technology*, 1-13.

Berrios Ugarte, M. E., Belmar, C. A., & Holwerda, H. T. (2007). Cropkitguía de manejo de nutrición vegetal de especialidad pimiento. *SQM The Worldwide Business Formula*, 33-36.

Biaus, A. J. (2017). Evaluación de la aplicación de nematocidas y hongos micorrízicos arbusculares sobre un cultivo de berenjena infestado con *Nacobbus aberrans* (Tesis de grado, Universidad Nacional de La Plata).

Bierhuizen, J. F., & Wagenvoort, W. A. (1974). Some aspects of seed germination in vegetables. 1. The determination and application of heat sums and minimum temperature for germination. *Scientia Horticulturae*, 2: 213-219.

Bongiorno, M., Larrosa, C., Maidana, A., Arenas, M., Cruz, Y., López, R., & Cap, G. (2009). Biofumigación con recursos locales: el caso de la producción hortícola de los quinteros del Parque Pereyra Iraola. *LEISA Revista de Agroecología*, 25(4), 25-28..

Bosco, M. R. O., Oliveira, A. B., Hernandez, F. F. F., & Lacerda, C. F. (2009). Efeito do NaCl sobre o crescimento, fotossíntese e relações hídricas de plantas de berinjela. *Revista Ceres*, 56, 296-302.

Botello, E. E., Cerrato, R. F., Moss, C. S., Rincon, J. A. S., & Lizaola, R. Q. (1999). Interacción del nematodo *Meloidogyne chitwoodi* con tres especies de hongo *glomus* sp. en la producción y distribución de materia seca de plantas jóvenes de maíz. *Terra Latinoamericana*, 17(1), 17-25

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

Brand, D., Roussos, S., Pandey, A., Zilioli, P., Pohl, J., & Soccol, C. (2004). Development of a bionematicide with *Paecilomyces lilacinus* to control *Meloidogyne incognita*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118:81-88.

Brand, D., Soccol, C., Sabu, A., & Roussos, S. (2010). Production of fungal biological control agents through solid state fermentation: a case study on *Paecilomyces lilacinus* against root-knot nematodes. *Micologia Aplicada Internacional*, 1(22), 31.

Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S., & Peferoen, M. (1992). Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran mudgut membranes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60(3), 247-253.

Butcher, J. D., Crosby, K. M., Yoo, K. S., Patil, B.; Jifon, J. L., & Rooney, W. L. (2013). Heterosis in different F1 *Capsicum annuum* genotypes for fruit traits, ascorbic acid, capsaicin, and flavonoids. *Scientia Horticulturae*, 159: 72-79.

Carter, A. K., & Vavrina, C. S. (2001). High temperature inhibits germination of Jalapeno and Cayenne pepper. *HortScience*, 36: 724-725.

Castillo, P. G., & Marbán-Mendoza, N. (1984). Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne & Allen 1944 en raíces de *Capsicum annuum* y *C. baccatum*. *Agrociencia*, 56: 85-93.

Cavello, I. A., Crespo, J. M., García, S. S., Zapiola, J. M., Luna, M. F., & Cavalitto, S. F. (2015). Plant growth promotion activity of keratinolytic fungi growing on a recalcitrant waste known as "Hair Waste". *Biotechnology research international*.

Cavero, J., Ortega, R. G., & Zaragoza, C. (1995). Influence of fruit ripeness at the time of seed extraction on pepper (*Capsicum annuum*) seed germination. *Scientia Horticulturae*, 60: 345-352.

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

Censo Hortiflorícola de Buenos Aires (CHFBA). (2005). Publicación de información de la Región de La Plata. Ministerio de Asuntos Agrarios y Ministerio de Economía de la Prov. de Buenos Aires.

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

Clark, R. B., Zobel, R. W., & Zeto, S. K. 1999. Effects of mycorrhizal fungi isolates on mineral acquisition by *Panicum virgatum* in acidic soil. *Mycorrhiza*, 9,167-176

Consejo Federal de Investigaciones (CFI). (2016). Informe del Sector Hortícola en la Argentina. Disponible en: <http://cfi.org.ar/nota/informe-del-sector-horticola-en-la-argentina/>.

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

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

Costilla, M. A. (1985). El falso nematode del nudo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 y su relación con el cultivo de papa en el Noroeste argentino. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 62, 79-97.

Cristóbal, A. J., I. Cid del Prado V., N. Marbán-Mendoza, G. P. Sánchez, G. MoraAguilera y L. R. H. Manzanilla. (2001). Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. *Nematrópica*, 31:229-235.

De Andrade, S. A. L., da Silveira, A. P. D., Jorge, R. A., & de Abreu, M. F. (2008). Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. *International journal of Phytoremediation*, 10(1), 1-13.

De Maagd, R. A., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics*, 17(4), 193-199.

De La Peña, E., Echeverría, S. R., Van Der Putten, W. H., Freitas, H., & Moens, M. (2006). Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. *New Phytologist*, 169(4), 829-840.

Del Pino, M. (2020). Guía didáctica: cultivo y manejo del pimiento. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias. Curso de Horticultura y Floricultura. pp 1-6. Disponible en: <file:///D:/Users/Net/Downloads/Gu%C3%ADa%20de%20Pimiento%202020.pdf>.

Demir, I., & Ellis, R. H. (1992). Development of pepper (*Capsicum annuum*) seed quality. *Annals of Applied Biology*, 121: 385-399.

Díaz Franco, A., Alvarado Carrillo, M., Ortiz Chairez, F., & Grageda Cabrera, O. (2013). Nutrición de la planta y calidad de fruto de pimiento asociado con micorriza arbuscular en invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(2), 315-321.

Doucet, M. E., & Lax, P. (2005). El género *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 en Argentina. 6. La especie *N. aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Tylenchida) y su relación con la agricultura. In *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria* (Vol. 59, pp. 5-45).

Editorial de Riego. (2020). Procesos fisiológicos y productivos óptimos en pimiento. Disponible en: <https://www.editorialderiego.com/2020/09/procesos-fisiologicos-y-productivos-optimos-en-pimiento/>

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

Fernández Lozano, J. (2012). La producción de hortalizas en Argentina. Reporte de la Secretaría de Comercio Interior, Mercado Central de Buenos Aires. Disponible en: <http://www.mercadocentral.gob.ar/zip tecnicas/la produccion de hortalizas en argentina.pdf>.

Filion, M., St-Arnaud, M., & Fortin, J. A. (1999). Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New phytologist*, 141(3), 525-533.

Flores-Camacho, R., Atkins, S.D., Manzanilla-López, R.H., Cid Del Prado-Vera, I.,

Garat, J. J., Ahumada, A., Otero, J., Terminiello, L., Bello, G., & Ciampagna, M. L. (2009). Las hortalizas típicas locales en el cinturón verde de La Plata: su localización, preservación y valorización. *Horticultura Argentina*, 28(66), 32-39.

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

Garat, J. J., Ahumada, A., Otero, J., Terminiello, L., Bello, G., & Ciampagna, M. L. (2009). Las hortalizas típicas locales en el cinturón verde de La Plata: su localización, preservación y valorización. *Horticultura Argentina*, 28(66), 32-39.

García, M. (2012). Análisis de las transformaciones de la estructura agraria hortícola platense en los últimos 20 años. El rol de los horticultores bolivianos. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de La Plata.

Gianinazzi, S.; Gollotte, A.; Binet, M.; van Tuinen, D.; Redecker, D.; Wipf, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20(8), 519-530.

Giovannetti, M., Sbrans, C., Avio, L., Citernes, A. S., & Logi, C. (1993). Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist*, 125:587-593.

Glare, T. R., & O'callaghan, M. (2000). *Bacillus thuringiensis biology, ecology and safety* (No. 632.951 G5).

González, A., & Franco, J. (1997). Los nematodos en la producción de semilla de papa. En: Producción de tubérculos-semillas de papa: manual de capacitación. Centro Internacional de la Papa (CIP) (3)9, 13.

Gortari, M. C., & Hours, R. A. (2016). Conidial production of *Purpureocillium lilacinum* LPSC# 876 on solid substrates. Effect on *Nacobbus aberrans* in tomato plants. *Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata)*, 115(2), 239-249.

Gryndler, M. (2000). Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. In *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function* (pp. 239-262). Springer, Dordrecht.

Gunasekera, K. L., Holland, R. J., Williams, T. S., & Nevelainen, K. M. H. (2002). Ultra-structure and properties of *Paecilomyces lilacinus* spores. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 879-885.

Gupta, A., Sharma, S., & Naik, S. N. (2011). Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites, and nematodes. *International biodeterioration & biodegradation*, 65(5), 703-707.

Hewezi, T., & Baum, T. J. (2013). Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(1), 9-16.

Hoel, B. O., & Solhaug, K. A. (1998). Effect of irradiance on chlorophyll estimation with the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Annals of Botany*, 82(3), 389-392.

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

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

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

Inglis, P. W., Tigano, M. S., & Valadares-Inglis, M. C. (1999). Transformation of the entomopathogenic fungi, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces lilacinus* (deuteromycotina: hyphomycetes) to benomyl resistance. *Genetics and molecular biology*, 22(1), 119-123.

Jung, S. C., Martínez-Medina, A., López-Ráez, J. A., & Pozo, M. A. (2012). Mycorrhiza induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6), 651-664.

Kaya, C., Ashraf, M., Sonmez, O., Aydemir, S., Levent Tuna, A., & Ali Cullu, M. (2009). The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horticulturae*, 121:1-6.

Khalil, M. S. E. D. H., Alam, A. F. G., & Barakat, A. S. T. (2012). Nematicidal activity of some biopesticide agents and microorganisms against root-knot nematode on tomato plants under greenhouse conditions. *Journal of Plant Protection Research*, 52(1).

Kiewnick, S., & Sikora, R. (2005). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological control*, 38:179-187.

Krajinski, F., Biela, A., Schubert, D., Gianinazzi-Pearson, V., Kaldenhoff, R., & Franken, P. (2000). Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of Mtaqp1 encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta*, 211, 85-90.

Kyde, M. M., & Gould, A. B. (2000). Mycorrhizal endosymbiosis. *Microbial endophytes liver. Marcel Dekker Blackwell. Londres*, 161-198.

Larsen, J., & Bødker, L. (2001). Interactions between pea root-inhabiting fungi examined using signature fatty acids. *New Phytologist*, 149, 487-493.

Lax, P., Becerra, A., Soteris, F., Cabello, M., & Doucet, M. E. (2011). Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* in tomato plants. *Biology and Fertility of Soils*, 47:591–597.

Lecadet, M. M. (2013). *Bacillus thuringiensis* toxins the proteinaceous crystal. *Bacterial Protein Toxins*, 3, 437-471.

Linderman, R. G. (1988). Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology*, 78, 366-371.

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

Liu, R., Dai, M., Wu, X., Li, M., & Liu, X. (2012). Suppression of the root-knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood] on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria. *Mycorrhiza*, 22(4), 289-296.

Ludvik, B., Giardina, E., & Benedetto, A. D. (2017). Physiological requirements and technological restrictions for sweet pepper cropping. *Horticultura Argentina*, 36(91), 122-152.

Lutts, S., Kinet, J. M., & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of botany*, 78(3), 389-398.

Manzanilla-López, R. H., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R. N., Lehman, P. S., Cid del Prado-Vera, I., Souza, R. M., & Evans, K. (2002). The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica*, 32:149-227.

Márquez Gutiérrez, M. E., & Fernández González, E. (2006). *Selección de cepas de Bacillus thuringiensis con efecto nematocida* (No. Hm).

Marmioli, N., Pavesi, A., Cola, G. D., Hartings, H., Raho, G., Conte, M. R., & Perrotta, C. (1993). Identification, characterization, and analysis of cDNA and genomic sequences encoding two different small heat shock proteins in *Hordeum vulgare*. *Genome*, 36(6), 1111-1118.

Mohammed, S.H.; Anwer M., Mohamed, R.E.; Ibrahim, N.E, Ghareeb, A. and Moustafa, S.A. 2008. Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 7(1), 57-66.

Mukhtar, T., Arshad, M., & Zameer, M. (2013). Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra. *Phytopathologia Mediterranea*, 52 (1):66–76.

Núñez-Camargo, M. C., Carrión, G., Núñez-Sánchez, A. E., & López-Lima, J. D. (2012). Evaluación de la patogenicidad in vitro de *Purpureocillium lilacinum* sobre *Globodera rostochiensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystem*, 15(2), 126–134.

Norton, D. C., & Norton, D. C. (1978). *Ecology of plant-parasitic nematodes* (No. SB998. N45. N6713 1978.). New York: Wiley.

Oostenbrink, M. (1966). Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Mededelingen Van de land bouwhoghe school tewageningen, Nederland, 66(4), 1-46.

Oukarroum, A., Schansker, G., & Strasser, R. J. (2009). Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chla fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Plant Physiology*, 137, 188-199.

Pau, C. G., Leong, C. T. S., Wong, S. K., Eng, L., Jiwan, M., Kundat, F. R., & Majid, N. M. (2012). Isolation of indigenous strains of *Paecilomyces lilacinus* with antagonistic activity against *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14(2).

Paulitz, T. C., & Linderman, R. G. (1991). Mycorrhizal interactions with soil organisms. *Handbook of Applied Micology*, 77-129.

Pereira, G., Sánchez, M., Ríos, D., & Herrera, M. A. (2001). Micorriza vesículo arbusculares y su incidencia en el crecimiento de plántulas de *Eucalyptus camadulensis* Dehnn. *Bosque*, 22(2), 39-44.

Peña-Rojas, K., Donoso, S., Pacheco, C., Riquelme, A., Gangas, R., Guajardo, A., & Durán, S. (2018). Respuestas morfo-fisiológicas de plantas de *Lithraea caustica* (Anacardiaceae) sometidas a restricción hídrica controlada. *Bosque (Valdivia)*, 39(1), 27-36.

Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society*, 55(1), 158-161.

Plenchette, C., Fortin, J. A., & Furlan, V. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant and Soil*, 70, 199-209.

Pozo, M. J., Jung, S. C., López-Ráez, J. A., & Azcón-Aguilar, C. 2010. Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: The role of plant defence mechanisms. In: H. Koltai and Y. Kapulnik (eds.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, 193–207. Springer Netherlands, Dordrecht.

Pozo, M. J., Jung, S. C., Martínez-Medina, A., López-Ráez, J. A., Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (2013). Root allies: arbuscular mycorrhizal fungi help plants to cope with biotic stresses. In *Symbiotic endophytes* (pp. 289-307). Springer, Berlin, Heidelberg.

Prakob, W., Nguen-Hom, J., Jaimasit, P., Silapapongpri, S., Thanunchai, J., & Chaisuk, P. (2009). Biological control of lettuce root-knot disease by the used of *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Paecilomyces lilacinus*. *Journal of Agricultural Technology*, 5(1), 179-191.

Puertas, A.; de la Noval, B.M.; Martínez, B.; Miranda, I Fernández, F.; Hidalgo-Díaz, L. (2006). Interacción de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* con *Rhizobium* sp., *Trichoderma harzianum* y *Glomus clarum* en el control de *Meloidogyne incognita*. *Rev. Protección Vegetal*, 21(2), 80-89.

Quilambo, O. A. (2003). The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 539-546.

Ruscitti, M., Arango, M., Ronco, M., & Beltrano, J. (2011). Inoculation with mycorrhizal fungi modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(1), 15-25.

Safir, G. R. (1990). Micorrizas arbúsculo-vesicular y la productividad agrícola. *Biología de la productividad de cultivos*. AGT Editor, SA México, DF, 201-222.

Sánchez Delgado, G. A. (2007). Comportamiento de las principales variedades comerciales de tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill) al parasitismo de los nematodos “nudo de la raíz” (*Meloidogyne incognita*) y “rosario de la raíz” (*Nacobbus aberrans*) en Ibarra-Imbabura. Tesis de Ingeniero Agropecuario.

Sánchez Portillo, J. F. (2010). Efecto de quitina y quitosano sobre huevos y juveniles de nematodos formadores de nódulos radiculares, *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita* bajo condiciones de in vitro e in vivo. Posgrado en fitosanidad. Instituto de Enseñanza e Investigación en ciencias agrícolas, Montecillo, Texcoco, México. 130 pp.

Sarabia Ochoa, M., Martínez, M., & Abud, Y. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65-71.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus D., Baum J., & Feitelson, J. (1998). Bt and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 775-806.

Schouteden, N., De Waele, D., Panis, B., & Vos, C. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant-parasitic nematodes: a review of the mechanisms involved. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1280.

Sharma, I. P., & Sharma, A. K. (2017). Physiological and biochemical changes in tomato cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot nematode. *Symbiosis*, 71(3), 175-183.

Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F., & Huang, Y. (2008). Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Micorrhiza*, 18, 281-286.

Shurtleff, M. C., & Averre, C. W. (2000). *Diagnosing plant diseases caused by nematodes*. American Phytopathological Society (APS Press).

Sims, D. A., & Gamon, J. A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote sensing of environment*, 81(2), 337-354.

Sikora, R. A., & Fernández, E. (2005). Nematode parasites of vegetables. En: Luc, M.; Sikora, R. A.; Bridge, J. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 2. ed. Wallingford: CABI. 319-392.

Smith S. E., & Read D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. Elsevier, New York.

Souza Casadinho, O., & Bocero, S. (2008). Agrotóxicos: Condiciones de utilización en la horticultura de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica*, 9: 87-101.

Stavisky, A. (2010). Situación actual de la plasticultura en Argentina. En XXXIII Congreso Argentino de Horticultura. Rosario: Asociación Argentina de Horticultura (ASAHO).

Shreenivasa, K. R., Krishnappa, K., & Ravichandra, N. G. (2010). Survival and penetration of *Meloidogyne incognita* larvae in tomato roots in presence of arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 20(1).

Siddiqui, Z. A., & Akhtar, M. S. (2009). Effects of antagonistic fungi, plant growth-promoting rhizobacteria, and arbuscular mycorrhizal fungi alone and in combination on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Journal of general plant pathology*, 75(2), 144-153.

Tambussi, E. A. & Graciano, C. (2010). Capítulo 9. La fluorescencia modulada de la clorofila: método del pulso saturante. En: Técnicas de medición en ecofisiología vegetal: conceptos y procedimientos. M.E. Fernández & J. Gyenge (eds). Ed. INTA. Buenos Aires. 129-140.

Taylor, L. A. & Sasser, J. N. (1983). Biología, identificación y control de los nemátodos de los nódulos radicales. Universidad de Carolina del Norte. Traducido por Carlos Sosa-Moss. México. 23.

Valencia Serna, R. A., Guzmán Piedrahita, Ó. A., Villegas Estrada, B., & Castaño Zapata, J. (2014). Integrated management of phytoparasitic nematodes in dominico hartón plantain (Musa AAB SIMMONDS) seedlings. *Luna Azul*, (39), 165-185.

Vergara Alzate, D., Guzmán Piedrahita, O. A., & Leguizamón Caycedo, J. (2012). Efecto in vitro de *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-Ard et al. y *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. *Agronomía*, 20(2), 25–36.

Vestberg, M., Kukkonen, S., Saari, K., Parikka, P., Huttunen, J., Tainio, L., & Gianinazzi, S. (2004). Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Applied Soil Ecology*, 27(3), 243-258.

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

Wei, J. Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S. C., & Aroian, R. V. (2003). *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 2760–2765.

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

Zarco-Tejada, P. J., Miller, J. R., Morales, A., Berjón, A., & Agüera, J. (2004). Hyperspectral indices and model simulation for chlorophyll estimation in open-canopy tree crops. *Remote sensing of environment*, 90(4), 463-476.

Ziquan, Y., Peisheng, B., Weixing, Y., Fengjuan, Z., Lifang, R., Ziniu, Y., & Ming, S. (2008). A Novel Negative Regulatory Factor for Nematicidal Cry Protein Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(6): 1033–1039.

Zuckerman, B. M., Dicklow, M. B., & Acosta, N. (1993). A Strain of *Bacillus thuringiensis* for the Control of Plant Parasitic Nematodes. *Biocontrol of Science and Technology*, 3(1):41-46.