PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

Evaluación de la actividad nematófaga de hongos nativos para el control de nemátodos fitopatógenos

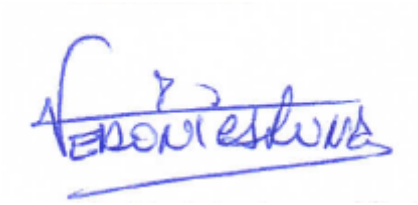
Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga

KATTY MELISSA VÉLEZ BRAVO

QUITO, 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Microbiología de la Srta. Katty Melissa Vélez Bravo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Mgtrr. Verónica Luna
Directora de la Disertación
Quito, 24 de febrero de 2023

DEDICATORIA

A todas las personas que amo y amaré.

AGRADECIMIENTOS

De todo corazón agradezco a Dios

A mis padres

A mis maestros

A mis tutores

A los Laboratorios de Nematología y Fitopatología de AGROCALIDAD

Al laboratorio KAWSAK S.A.S

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN……...1

ABSTRACT…….....1

INTRODUCCIÓN……...2

MATERIALES Y MÉTODOS…….....5

Recolección de muestras de suelo……..5

Aislamiento e identificación de hongos nematófagos……...6

Conservación de las cepas……..6

Identificación molecular de hongos nematófagos…….7

Identificación, extracción y recuento de nemátodos……7

Ensayos de evaluación de la actividad nematófaga……..8

RESULTADOS…….....9

Aislamiento y caracterización de hongos nematófagos……9

Ensayos de actividad nematófaga……11

Resultados de ensayos preliminares……12

Resultado ensayo final……..14

DISCUSIÓN…….....……16

CONCLUSIONES…….22

RECOMENDACIONES……...22

AGRADECIMIENTOS……..…..23

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....23

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Muestras con presencia de nemátodos, recolectadas en distintas localidades del Ecuador entre septiembre 2021 a abril 2022

Tabla 2. Hongos aislados seleccionados para evaluar su potencial nematófago en pruebas *in vitro.*

Tabla 3. Ensayos de actividad nematófaga de hongos aislados.

Tabla 4. Identificación molecular de cepas de hongos con mejor actividad nematófaga y resultados del ensayo.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. A) *Pochonia chlamydosporia* (50x); B) *Orbilia oligospora* (50x); C) *Arthrobotrys oligospora* (100x); D) Esporas de *Purpureocillium lilacinus* (100x); E) *Chaetomium globosum* (100x); F) *Arthrobotrys* sp. (40x). [Fotografías tomadas por Melissa Vélez].

Figura 2. A) Nemátodo atrapado por micelio de *Arthrobotrys* en agua (50 x). B) Anillo constrictor de *Arthrobotrys* en agua (100x); C-D-E) Nemátodos atrapados por micelio de hongos nematófagos en agar agua (55x). [Fotografías tomadas por Melissa Vélez].

Figura 3. Media de muerte de nemátodos después de 96 horas de incubación con 8 diferentes cepas de hongos.

MANUCRISTO PARA LA PUBLICACIÓN

Revista

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas

Título

Evaluación de la actividad nematófaga de hongos nativos para el control de nemátodos fitopatógenos

Autores

Katty Melissa Vélez Bravo

Verónica Cecilia Luna Unda

Ana Graciela Gordillo Artieda

Correo electrónico

kmvelez@puce.edu.ec

cvluna@puce.edu.ec

anygordillo@icloud.com

Dirección

Laboratorio de Micología, Nayón, Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Laboratorio de la empresa Kawsak S.A.S, Tumbaco

El siguiente trabajo de investigación se presenta en el formato de la *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* a partir de la siguiente página

Evaluación de la actividad nematófaga de hongos nativos para el control de nemátodos fitopatógenos

Evaluation of the nematophagous activity of native fungi for the control of plant-pathogenic nematodes.

Resumen

En los últimos años los biocontroladores han adquirido gran importancia en la agricultura para el control de enfermedades causadas por microorganismos como una alternativa al uso indiscriminado de controladores químicos, que encarnan un gran daño en la salud humana y en el medio ambiente. En el presente estudio, se evaluó la actividad nematófaga de las diferentes cepas de hongos de los géneros; *Arthrobotrys*, *Orbilia*, *Paecilomyces*, *Chaetomium*, *Mortierella*, *Trichoderma* y *Pochonia* a través de ensayos *in vitro.* Se realizaron los ensayos en placas de 6 pocillos con 600 µl del lavado de conidios de cada cepa a una turbidez del tubo 0,5 McFarland y una suspensión de 1 ml con al menos 100 nemátodos, de los géneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus* y *Helicotylenchus*; se incubó durante 96 horas para luego revisarlas en estereomicroscopio. Se realizó un screening inicial con los 25 aislados con 6 réplicas de cada uno, y se determinó las cepas de hongos más promisorias, por medio de análisis estadísticos, para luego realizar un ensayo final. Mediante una prueba ANOVA de una vía y una prueba de Tukey, se determinó como cepas con mayor actividad nematófaga a *A. oligospora* TMV-59 y *O. oligospora* TMV-55 con tasas de mortalidad del 76 y 68 % respectivamente.

Palabras clave: *Arthrobotrys, Orbilia,* biocontrolador, nematófaga, fitopatógenos

Abstract

In recent years, biocontrol agents have become of great importance in agriculture for the control of diseases caused by microorganisms as an alternative to the indiscriminate use of chemical control agents, which cause significant damage to human health and the

environment. In this study, the nematophagous activity of different strains of fungi from the genera *Arthrobotrys, Orbilia, Paecilomyces, Chaetomium, Mortierella, Trichoderma*, and *Pochonia* was evaluated through in vitro assays. The multiwell assays were performed in 6-well plates with 600 µl of conidial wash of each strain at a tube turbidity of 0.5 McFarland and a nematode suspension of 1 ml with at least 100 nematodes from the genera *Meloidogyne, Pratylenchus, and Helicotylenchus*. They were incubated for 96 hours and then observed under a stereomicroscope. An initial screening was conducted with 6 replicates of each of the 25 isolates, and the most promising fungal strains were determined through statistical analysis for a final assay. Through a one-way ANOVA test and a Tukey test, *A. oligospora* TMV-59 and *O. oligospora* TMV-55 showed the highest nematophagous activity, with mortality rates of 76% and 68%, respectively.

Keywords: *Arthrbotrys, Orbilia,* biocontrol agent, nematophagous, phytopathogens

Introducción

Los nemátodos son organismos en forma de gusano, redondos, largos y no segmentados que habitan en ecosistemas terrestres y acuáticos. Algunos de ellos son considerados fitopatógenos, junto con hongos, virus y bacterias (Uribe et al. 2020). Los nemátodos fitopatógenos presentan una estructura en forma de aguja denominada estilete que les ayuda a romper el tejido celular de la planta, lo que afecta su crecimiento e interrumpe sus procesos fisiológicos por la formación de nódulos o agallas. También, provocan la deformación de tallos y hojas y extraen parte del contenido celular. Además, al momento que obtienen su alimento de las raíces producen lesiones mecánicas que permiten la entrada de otros microorganismos patógenos. Por último, secretan ciertas enzimas que provocan la muerte y desintegración del tejido celular de la planta. De esta manera, originan una pérdida anual en los cultivos del 11 al 14 %, lo que representa alrededor de 80 billones de dólares (Chen et al. 2004; Agrios 2004; Guzmán et al. 2012).

La mayoría de las pérdidas de cosechas por nemátodos a nivel mundial son causadas por los géneros *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* y *Globodera* (Treviño 2015). El control de nemátodos patógenos en los cultivos enfrenta desafíos, sobre todo para garantizar la producción y la calidad de las cosechas (Sikora et al. 2018), siendo los controladores químicos la opción principal utilizada. Sin embargo, este método encarna un alto riesgo medioambiental (Talavera 2003) y para el ser humano.

Los controladores químicos de nemátodos pueden provocar problemas en el medio ambiente como la contaminación de suelos, aguas y su transmisión a la cadena trófica y causar, además, efectos a corto y largo plazo en la salud humana como cáncer, malformaciones congénitas, esterilidad y abortos (Aceves et al. 2015). La resistencia, que es otra de las consecuencias causadas por este tipo de controladores, se presenta cuando ocurren mutaciones genéticas en una parte de la población de nemátodos que les permiten sobrevivir a los efectos del nematicida, incluso transferir estos genes a generaciones posteriores que, eventualmente, se multiplicarán y entonces el controlador químico deja de ser efectivo (Hernández 2012; Treviño 2015).

Los biocontroladores son elaborados a base de uno o varios organismos antagónicos al microorganismo patógeno para controlar o eliminar este último (Stirling 2014). En los últimos años, los controladores a base de microorganismos han adquirido gran importancia para el control de enfermedades en la agricultura (Cantillo et al. 2018). La búsqueda de controladores biológicos puede resultar conveniente para las industrias agrícolas por su bajo costo e inocuidad para el medio ambiente y el ser humano. Así, los biocontroladores han atraído a empresas agrícolas en Ecuador (y el mundo), durante los últimos años (Hidalgo 2017).

Entre los posibles controladores biológicos de nemátodos se encuentran hongos pertenecientes a las divisiones Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota y

Chytridiomycota (Perry y Moens 2013). Entre los hongos con actividad nematófaga más usados por las empresas agrícolas para el control de nemátodos fitopatógenos se encuentra el hongo *Paecilomyces lilacinus* con la capacidad de parasitar huevos (evitan su eclosión) y hembras de nemátodos fitopatógenos (provocan destrucción en los ovarios) (Restrepo 2018) (Piedra 2008). También afectan al sistema nervioso y provocan deformaciones en el estilete (Cañón y Sanabria 2017) o puede afectar nemátodos móviles que están fuera de las raíces, pues las esporas de este hongo secretan enzimas, como las proteasas y quitinisas, que diluyen la cutícula y penetran al interior del nemátodo (Castillo y Medina 2014; Dávila y Clímaco 2005).

Otro controlador biológico es *Arthrobotrys,* con la capacidad de atacar, matar y digerir nemátodos (adultos, juveniles y huevos) de varios géneros, incluidos los de vida libre, a pesar de que se lo ha evaluado mayormente para determinar su eficacia ante nemátodos de mayor importancia económica como los pertenecientes a los géneros *Meloidogyne, Heicotylenchus, Pratylenchus* y *Globodera* (Singh et al. 2013; Gonzales 2013). Este hongo puede vivir de forma saprófita en materia orgánica en descomposición y atacar a otros hongos. Esto le concede una ventaja frente a otros biocontroladores microbianos (Perry y Moens 2006). *Arthrobotrys* desarrolla micelios en forma de argolla, capaces de capturar los nemátodos. Además, segrega una sustancia adhesiva en la superficie de las hifas que ayuda a su captura. (Chen et al. 2004). A medida que crece, se forman redes de hifas y anillos que constituyen trampas para los nemátodos que pasan cerca (López y Jansson 2001). Así, *Arthrobotrys* se presenta como una propuesta interesante para uso masivo, debido a su fácil y económico crecimiento. Puede ser aislado de diversos sustratos, como suelo, estiércol, compost o madera en descomposición (Chen et al. 2004).

En ese sentido, la propuesta de investigación pretende determinar si *Arthrobotrys* y otros hongos nematófagos son eficientes para el biocontrol de nemátodos que afectan los

cultivos agrícolas y resultan efectivos como una alternativa al uso de agroquímicos nematicidas.

Materiales y Métodos

Recolección de muestras de suelo

Las muestras fueron recolectadas de diferentes cultivos como flores, durazno, lechuga, tomate, pepino, mora, jícama, hortalizas, apio, papa y rosas con aparente presencia de nemátodos patógenos, por la sintomatología descrita brevemente arriba. Se procesaron un total de 24 muestras, de las cuales se obtuvieron aislados en 16 de ellas (Tabla 1). Las muestras fueron procesadas en máximo 24 horas a partir de la recolección.

Tabla 1. Muestras con presencia de nemátodos, recolectadas en distintas localidades del Ecuador entre septiembre 2021 a abril 2022

Ítem	Muestra de suelo	Origen
1	Cultivo de rosas	Cayambe
2	Cultivo de rosas	Cayambe
3	Cultivo de lechuga criolla	Guayllabamba
4	Cultivo de rosas	Pifo
5	Cultivo de flores	Tumbaco
6	Cultivo de hortalizas	Santo Domingo
7	Cultivo de durazno	Pomasqui
8	Cultivo de tomate	Guayllabamba
9	Cultivos orgánicos	Guayllabamba
10	Cultivo de jícama	Latacunga
11	Cultivo de papa	Latacunga
12	Cultivo de maíz	Latacunga

13	Cultivo de alfalfa	Latacunga
14	Cultivo de nabo	Latacunga
15	Cultivo de hortalizas	Latacunga
16	Cultivo de mora	Latacunga

Aislamiento e identificación de hongos nematófagos

Para el aislamiento de hongos nematófagos se realizó la técnica de "espolvoreado en placa con agar agua" descrita por Barrón en 1977 (Peraza et al. 2011). La técnica se llevó a cabo en cajas Petri con agar agua, donde se espolvoreó 1 gramo de la muestra de suelo de cultivos con aparente infección de nemátodos, con tres repeticiones por muestra y se dejó incubar a temperatura ambiente durante tres semanas con controles cada 5 días para observar la asociación hongo-nemátodo. A continuación, con la ayuda de un asa en "L", se cortó el agar alrededor de la asociación, se colocó en agar papa dextrosa (PDA) más antibiótico y se dejó incubar durante 5 días a temperatura ambiente (Nicola et al. 2014), para su purificación. Luego, el hongo de interés se sembró en diferentes medios de cultivo PDA, agar extracto de malta (MEA) y agar avena (OA) para la descripción macroscópica de la colonia e identificación del hongo.

Los cultivos se incubaron a 25 ± 1 ºC con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Las características del cultivo se determinaron 7 días después de la inoculación. La identificación del género se realizó en base a los colores y características macroscópicas de las colonias, además de las estructuras microcópicas, es decir, condióforos, células conidiógenas y conidios.

Conservación de las cepas

Todas las cepas se conservaron en agar inclinado con aceite y agua, y se criopreservaron. En el primer procedimiento, los hongos se cultivaron en MEA, OA y PDA en tubos

inclinados y se cubrieron con aceite mineral o agua estériles. Los tubos se almacenaron a 4 ºC de temperatura.

Identificación molecular de hongos nematófagos

Las ocho cepas seleccionadas con mejor actividad nematófaga fueron identificadas de manera molecular, con la amplificación del fragmento ITS, barcoding para hongos (Tabla 4).

Identificación, extracción y recuento de nemátodos

Para la ejecución de ensayos de asociación hongo-nemátodo, se obtuvieron nemátodos a partir de una muestra de suelo positiva para nemátodos fitopatógenos, que fueron identificados por medio de la clave de Nemátodos Parásitos de Plantas en el laboratorio de nematología de AGROCALIDAD.

La extracción de nemátodos se realizó mediante el método de incubación, en el mencionado laboratorio. Esta técnica consistió en homogenizar la muestra de suelo, tomar 100 gramos y dispersarlos formando una lámina fina sobre una malla de acero inoxidable de 350 µm con papel toalla humedecido extendido sobre ella. Esto se dispuso sobre una bandeja de acero inoxidable en la que se agregó agua hasta cubrir el suelo, se cubrió con una tapa para evitar la evaporación del agua y se lo dejó incubar durante tres días. A continuación, se retiró el papel con el suelo y, con la ayuda de una piseta, se lavó la malla sobre el plato base y se filtró el contenido con un tamiz de 38 μm; el filtrado sobre el tamiz se colectó en un vaso de precipitación que se aforó a 100 ml con agua. Se dejó sedimentar la muestra recolectada en el vaso de precipitación durante 3 a 5 minutos, y se descartó gran parte del sobrenadante en otro vaso. A continuación, se mezcló el contenido del primer vaso y con una pipeta se recogió 5 ml de la muestra para observar al microscopio y realizar un conteo de los nemátodos fitopatógenos encontrados. Se

realizaron tres conteos de cada muestra y se determinó el número de nemátodos en 100 ml (Vargas 2008; Triviño et al. 2013).

Ensayos de evaluación de la actividad nematófaga

Para evaluar la actividad nematófaga de los aislados se aplicó la técnica de micropocillos de Stadler con las modificaciones, realizada por Nicola et al. (2014). Estos ensayos *in vitro* se ejecutaron en placas de plástico de 6 pocillos. Se realizó un lavado de esporas de cada uno de los cultivos fúngicos con un crecimiento de 10-15 días y se los llevó a una turbidez del tubo 0,5 McFarland. En cada pocillo, se colocaron 600 µl de la suspensión del hongo y 1 ml de agua con, al menos, 100 nemátodos, con 6 réplicas cada cepa. El control negativo consistió en 600 µl de agua estéril y 1 ml de la suspensión de nemátodos. Se dejó incubar durante 96 horas a temperatura ambiente y, transcurrido este tiempo, se leyeron los resultados en un estéreomicroscopio Euromex NZ. 1902-S, Nexius zoom bino, contando los nemátodos atrapados e inmovilizados por el hongo.

Con esta técnica, se realizaron cuatro ensayos, aproximadamente cada dos meses, con las cepas que se fueron encontrando. En cada ensayo se determinó la o las cepas con mayor actividad nematófaga. Luego, se realizó un ANOVA de una vía de cada uno de los ensayos preliminares. A continuación, se realizó una prueba Tukey utilizando el software estadístico Minitab, con lo cual se escogió los hongos con mayor actividad nematófaga, y con ellos se montó un ensayo final siguiendo la misma metodología para establecer los mejores aislados.

Resultados

Aislamiento y caracterización de hongos nematófagos

Se aislaron 61 hongos a partir de las asociaciones hongo-nemátodo observadas en las cajas con agar agua. Posteriormente, las cepas aisladas fueron identificadas en base a sus

características macro y microscópicas en diferentes medios de cultivo; PDA, OM y EM, siguiendo claves taxonómicas; algunos aislados quedaron como micelio estéril pues no se evidenciaron estructuras como conidiofos que permitan dar una clasificación taxonómica al aislado.

De acuerdo con la identificación morfológica de las 61 cepas aisladas, se pudieron determinar géneros de interés para ensayos posteriores, así como también géneros fitopatógenos como *Fusarium*, *Mucor*, *Botrytis*, *Aspergillus* y *Phytium* que fueron excluidos del estudio. Los hongos de interés para los ensayos fueron un total de 25 descritos en la tabla 2. (Figura 1).

Tabla 2. Hongos aislados seleccionados para evaluar su potencial nematófago en pruebas *in vitro.*

Código del laboratorio	**Identificación**	**Cultivo**	**Localidad**
TMV-AA-2	*A. oligospora*	Rosas	Pifo
TMV-AA-10	*Trichoderma* sp.	Lechuga	Guayllabamba
TMV-AA-27	*A. oligospora*	Rosas	Cayambe
TMV-AA-28	*Purpureocillium lilacinus*	Hortalizas	Santo Domingo
TMV-AA-29	*P. chlamydosporia*	Hortalizas	Santo Domingo
TMV-AA-30	*C. globosum*	Rosas	Cayambe
TMV-AA-35	*A. oligospora*	Cultivos orgánicos	Guayllabamba
TMV-AA-36	Micelio estéril*	Cultivos orgánicos	Guayllabamba
TMV-AA-44	*O. oligospora*	Flores	Tumbaco
TMV-AA-51	*Trichoderma* sp.	Durazno	Pomasqui
TMV-AA-54	*O. oligospora*	Cultivos orgánicos	Guayllabamba

TMV-AA-55	*O. oligospora*	Durazno	Pomasqui
TMV-AA-56	*Arthrobotrys* sp.	Tomate	Guayllabamba
TMV-AA-59	*A. oligospora*	Hortalizas	Latacunga
TMV-AA-60	*Penicillium fellutanum*	Papa	Latacunga
TMV-AA-61	Micelio estéril*	Alfalfa	Latacunga
TMV-AA-62	*Arthrobotrys* sp.	Nabo	Latacunga
TMV-AA-66	Micelio estéril*	Jícama	Latacunga
TMV-AA-67	*A. oligospora*	Jícama	Latacunga
TMV-AA-71	Micelio estéril*	Maíz	Latacunga
TMV-AA-72	Micelio estéril*	Maíz	Latacunga
TMV-AA-73	*Mortierella*	Hortalizas	Latacunga
TMV-AA-75	*A. oligospora*	Alfalfa	Latacunga
TMV-AA-76	Micelio estéril*	Mora	Latacunga
TMV-AA-80	*Paecilomyces* sp.	Mora	Latacunga

* Cepas de hongos que no se han podido identificar pues no presentaron estructuras de reproducción en las condiciones en las que se cultivaron.

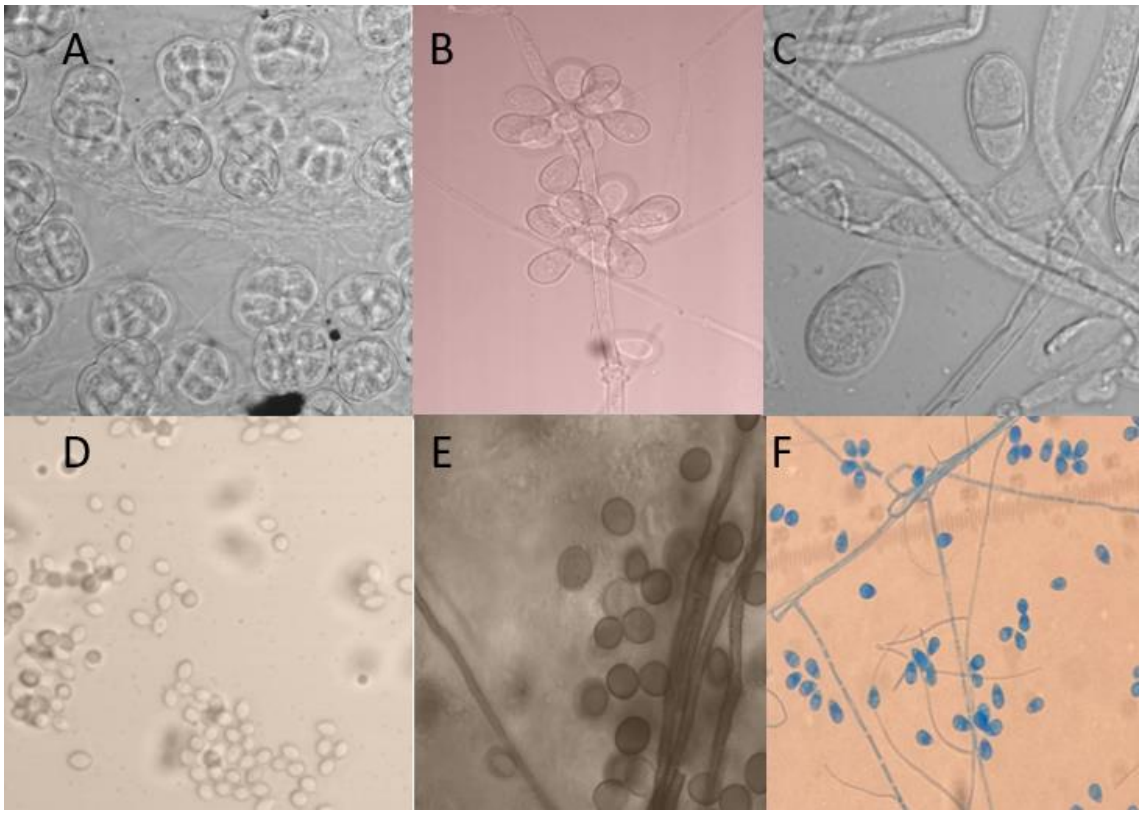


Figura 1. A) *Pochonia chlamydosporia* (50x); B) *Orbilia oligospora* (50x); C) *Arthrobotrys oligospora* (100x); D) Esporas de *Purpureocillium lilacinus* (100x); E) *Chaetomium globosum* (100x); F) *Arthrobotrys* sp. (40x). [Fotografías tomadas por Melissa Vélez].

Identificación, extracción y recuento de nemátodos

Mediante una regla de tres se determinó el número de nemátodos en 100 ml.

Después por medio de la clave de Nemátodos Parásitos de Plantas en el laboratorio de nematología de AGROCALIDAD en un microscopio invertido, se identificaron los géneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus* y *Helicotylenchus*.

Ensayos de actividad nematófaga

En todos los ensayos, después del período de incubación de 96 horas, se procedió a contar los nemátodos atrapados o parasitados por el hongo con la ayuda de un estereomicroscopio, que permitió observar las asociaciones (Figura 2).

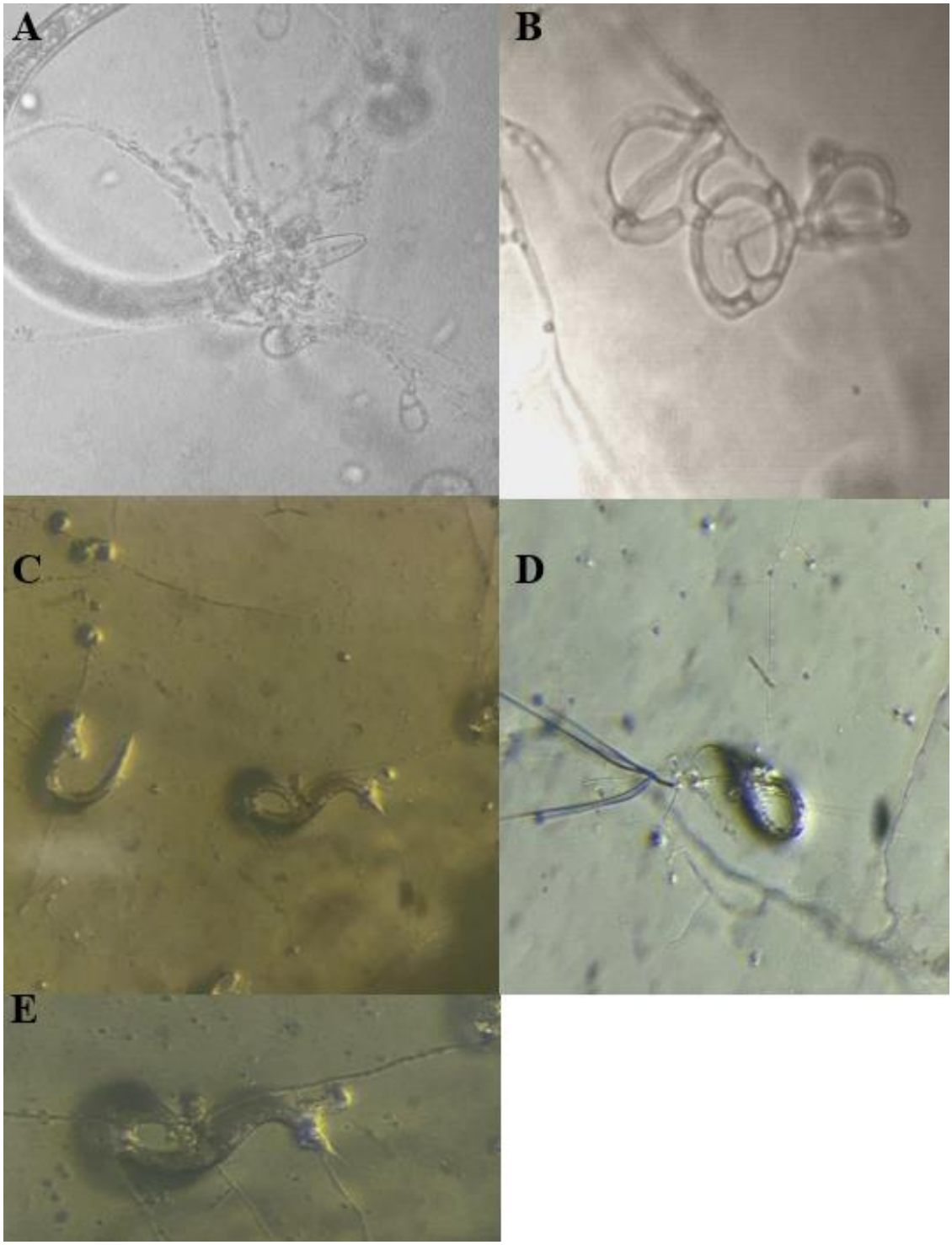


Figura 2. A) Nemátodo atrapado por micelio de *Arthrobotrys* en agua (50 x). B) Anillo constrictor de *Arthrobotrys* en agua (100x); C-D-E) Nemátodos atrapados por micelio de hongos nematófagos en agar agua (55x). [Fotografías tomadas por Melissa Vélez].

Resultados de ensayos preliminares

Los resultados de los análisis estadísticos de los ensayos preliminares se resumen en la tabla 3.

Tabla 3 Ensayos de actividad nematófaga de hongos aislados.

# ensayo	Código de aislado	Identificación	Media-Tasa de mortalidad (%) Tukey
1	TMV-55	*Orbilia* sp.	*65 A
	TMV-56	*Arthrobotrys* sp.	*62 A
	TMV-27	*Arthrobotrys* sp.	42 B
	TMV-54	*Orbilia* sp.	37 C
	TMV-51	*Trichoderma* sp.	29 D
2	TMV-2	*Arthrobotrys* sp.	*58A
	TMV-35	*Arthrobotrys* sp.	*53A
	TMV-29	*Pochonhia* sp.	*49B
	TMV-28	*Purpureocillium* sp.	36C
	TMV-30	*Chaetomium* sp.	30C
	TMV-10	*Trichoderma* sp.	17D
3	TMV-44	*Orbilia* sp.	*54A
	TMV-59	*Arthrobotrys* sp.	*****61**A**
	TMV-67	*Arthrobotrys* sp.	44B
	TMV-62	*Arthrobotrys* sp.	37C
	TMV-60	*Penicillium* sp.	33C
	TMV-36	Micelio estéril	26D
	TMV-61	Micelio estéril	18E

	TMV-66	Micelio estéril	36^{F}
4	TMV-73	*Mortierella* sp.	$*44^{A}$
	TMV-80	*Paecilomyces* sp.	35^{B}
	TMV-72	Micelio estéril	33^{B}
	TMV-75	*Arthrobotrys* sp.	23^{C}
	TMV-76	Micelio estéril	17^{C}
	TMV-71	Micelio estéril	2^{D}

* Cepas con el mejor promedio, en cada uno de los ensayos

Resultado ensayo final

En el ensayo final para determinar las cepas con mejor actividad nematófaga, los porcentajes de mortalidad obtenidos (Figura 2) fueron tratados con un análisis de varianza que mostró diferencia significativa ($p<0,05$) entre los aislados.

Al realizar la prueba de Tukey se determinó que *A. oligospora* TMV-59 y *O. oligospora* TMV-55 (Tabla 4) presentaron la mejor actividad nematófaga. Estos aislados fueron obtenidos de cultivos orgánicos de hortalizas de la localidad de Latacunga y de durazno de Pomasqui, respectivamente.

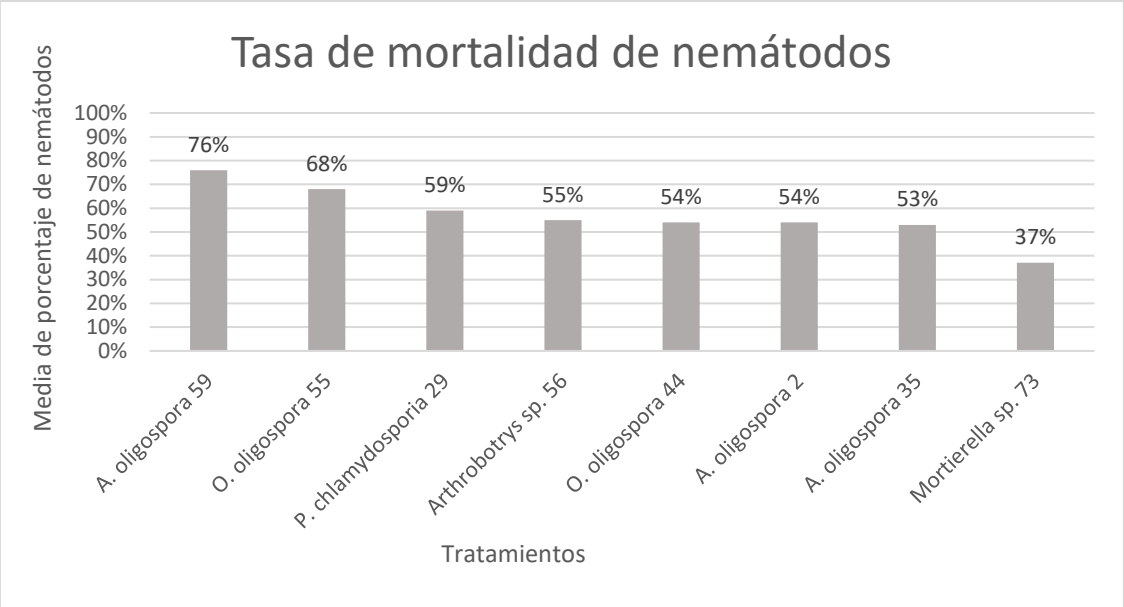


Figura 3. Media de muerte de nemátodos después de 96 horas de incubación con 8 diferentes cepas de hongos.

Por último, estas ocho cepas fueron identificadas de manera molecular, con la amplificación del fragmento ITS, barcoding para hongos (Tabla 4). **Tabla 4.** Identificación molecular de cepas de hongos con mejor actividad nematófaga y resultados del ensayo

Código	**Cepa**	**Secuencia NCBI Nº Accesión**	**% de identidad**	**Media-Tasa de Mortalidad (%) TUKEY**	**Desviación estándar**
TMV-59	*A. oligospora*	MN944424.1	100.00%	76^{A}	4,32
TMV-55	*O. oligospora*	MZ427474.1	99.85%	68^{A}	3,74

TMV-29	*P. chlamydosporia*	MW995746.1	99.83%	59 [B]	3,27
TMV-56	*Arthrobotrys* sp.	N/A	N/A	55 [B]	3,82
TMV-2	*A. oligospora*	MF926588.1	99.08%	54 [B]	2,345
TMV-44	*O. oligospora*	MZ427474.1	99.69%	54 [B]	32,6
TMV-35	*A. oligospora*	MF926585.1	99.26%	53 [B]	2,93
TMV-73	*Mortierella*	MT009480.1	97.92%	37 [C]	4,47

N/A no hay identificación molecular

Discusión

En el presente trabajo de investigación se pretendió determinar la actividad nematófaga de diferentes cepas de hongos aislados a partir de muestras de suelo de cultivos con aparente infestación de nemátodos. El género *Meloidogyne* spp. es el nemátodo de mayor importancia económica en Ecuador y a nivel mundial debido a su amplia capacidad de asociación con diferentes especies de plantas, llegando afectar alrededor de 800 especies en el Ecuador (Bustamante y Ordoñez 2020). Adicionalmente, a los géneros *Helicotylenchus* y *Pratylenchus* también se les atribuye una gran importancia económica en el país (Guzmán 2011). Por esta razón en los ensayos realizados se utilizaron estos géneros de nemátodos.

Como ya se mencionó, en este estudio se encontraron y estudiaron los siguientes géneros de hongos con posible actividad nematófaga: *Arthrobotrys, Paecilomyces, Pochonia, Trichoderma, Penicillium, Chaetomium* y *Mortierella.*

El género fúngico *Arthrobotrys* descrito por Fresen en 1850 (Niu y Zhang 2011) se encuentra dentro de los 12 géneros de hongos pertenecientes a la familia Orbiliaceae, del orden Orbiliales y clase Orbiliomycetes de la división Ascomycota (Agrios 2004). La característica principal de los Orbiliomycetes es la capacidad de utilizar nemátodos y otros gusanos como fuente de nutrientes, para lo cual desarrollan mecanismos para atraparlos (Baral et al. 2020; Ainsworth y Bisby, 2008) como trampas conidiales y miceliales; redes adhesivas, anillos constrictores, anillos no constrictores y ramas adhesivas (Agrios 2005). En el presente estudio, seis de las ocho mejores cepas probadas pertenecen a este género. *Orbilia oligospora* es el anamorfo de *Arthrobotrys oligospora* (Baral et al. 2020).

A. oligospora TMV-59 fue la cepa más activa, causando una tasa de mortalidad del 76 %, resultado que es similar con el obtenido en los ensayos *in vitro* realizados por Nicola et al. (2014) en la que las cepas más activas fueron *A. oligospora* con una tasa de mortalidad del 83 % y *A. dactyloides* con 84 %. En ese estudio determinaron la capacidad nematófaga de varias cepas de hongos. Compararon *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys dactyloides, Pochonia chlamydosporia* y *Pochonia bulbillosa* para reducir la población de nemátodos. Por otro lado, un estudio realizado por Singh et al. (2013) en condiciones de campo mostró como resultado de los ensayos con diferentes cepas de hongos que la aplicación de *A. oligospora* redujo el número de agallas producidas por *M. incógnita* en plántulas de tomate después de 30 días a partir de su inoculación y también ayudó a mejorar el crecimiento de la plántula. A pesar de ser un ensayo empleado en condiciones no controladas, *A. oligospora* mostró una alta actividad depredadora.

De acuerdo con Dávila y Clímaco (2005) y Treviño (2015) *A. oligospora* es el hongo nematófago más común en la zona rizosférica. En la presente investigación se aislaron 11 cepas pertenecientes a esta especie, de las cuales seis indujeron altas tasas de mortalidad en cada uno de los ensayos; *A. oligospora* TMV-2, *A. oligospora* TMV-35, *O. oligospora* TMV-55, *O. oligospora* TMV-44, *Arthrobotrys* sp. TMV-56 y *A. oligospora* TMV-59. Las diferentes cepas de *A. oligospora* no obtuvieron los mismos resultados de actividad nematófaga, sin embargo, se evidenció su capacidad de depredación. Por lo tanto es importante comparar varias cepas de hongos para lograr determinar de manera más efectiva la mejor de ellas.

Por otro lado, *Pochonia chlamydosporia* es un hongo perteneciente a la clase Hyphomycetes del filo Deuteromycota, que se caracteriza por parasitar huevos y hembras de diferentes especies de nemátodos formadores de agallas (Larriba et al. 2014). Este hongo es considerado un parásito facultativo aunque no produce toxinas ni trampas para atacar a los nemátodos. Además, tiene una amplia distribución en el suelo a nivel mundial y posee una gran capacidad para promover el crecimiento y la mejora del sistema de defensa de las plantas (Larriba et al., 2014) (Nicola et al. 2014). *P. chlamydosporia* TMV-29 mostró resultados de una alta actividad nematófaga comparada con los hongos probados en el ensayo preliminar número dos, sin embargo, en el ensayo final, se pudo evidenciar que *A. oligospora* TMV-59 y *O. oligospora* TMV-55 tienen una mayor tasa de mortalidad en comparación a la de *Pochonia chlamidosporia* (59 %). En pruebas *in vitro* realizadas por González (2016) se obtuvieron tasas de parasitismo mayor a 60 % y menciona que en estudios realizados de *Pochonia* sp. su actividad varía entre 63 y 67 %; lo que es similar con el resultado obtenido en esta investigación.

Ensayos realizados por Vieira et al. (2020) en los que probaron la actividad nematófaga de *A. cladodes* y *P. chlamydosporia* mostraron una actividad nematófaga mayor de estos dos hongos en conjunto que por separado.

Por su parte, *Mortierella* sp. es un género de hongo perteneciente a la familia Mortierellaceae, del orden Mortierellales de la división Zygomycota. Este hongo, a pesar de pertenecer a una división en la que se encuentran géneros con características nematófagas, no se han reportado estudios en los que se le atribuye actividad depredadora de nemátodos. Un estudio realizado por Erazo et al. (2020) por medio de análisis moleculares caracterizaron la diversidad de hongos con potenciales biotecnológicos presentes en bosques nativos de Ecuador, reportan a *Mortierella* sp. como un género en el que la mayoría de las especies son saprófitas y tienen la capacidad de acumular ácidos grasos insaturados, además, de producir ácidos grasos poliinsaturados, lo que les hace ser un potencial candidato para diversas aplicaciones biotecnológicas. También, muestran a *M. globulifera* como especie productora de proteasas, enzimas presentes en especies de hongos depredadores de nemátodos que ayudan a digerir su cutícula compuesta principalmente por proteínas (Sagués et al. 2011)(Castillo 2022). Sin embargo, la tasa de mortalidad de *Mortierella* sp. TMV-73 en este estudio fue del 37 %.

Entre las cepas de hongos evaluadas en los ensayos preliminares, también se encuentran *Trichoderma, Penicillium, Chaetomium* y *Paecilomyces*.

Paecilomyces lilacinus es un hongo filamentoso perteneciente a la familia Ophiocordycipitaceae, orden Hipocreales de la división Ascomicota. Este hongo se encuentra entre los hongos nematófagos más utilizados en el Ecuador para el control de nemátodos, principalmente *Meloidogyne* sp. (Restrepo 2018).

En ensayos realizados por Mokbel y Alharbi (2014) *P. lilacinus* muestra porcentajes de parasitismo sobre masas de huevos de *M. javanica,* entre 45 y 52 %. Mientras que en

pruebas *in vitro* realizadas por Varela et al. (2016) *P. lilacinus* junto a *Trichoderma asperellum* muestra porcentajes de mortalidad mayores al 80 %. También, Goswami y Mittal (2004) reportan, en sus ensayos, un porcentaje de parasitismo de *P. lilacinus* sobre *M. incógnita* del 25 % en pruebas *in vitro*. Sin embargo, después de una semana de inoculación, mostró que parasitó el 70 % de los huevos de nemátodos. En la presente investigación las cepas de *P. lilacinus* TMV-28 y TMV-80 mostraron porcentajes de mortalidad del 36 y 35 % respectivamente, en los ensayos preliminares, a las 96 horas de incubación. De acuerdo con la bibliografía estudiada, *P. lilacinus* tiene una tasa más elevada de mortalidad en nemátodos con un mayor tiempo de incubación lo cual lo clasificaría como uno de los biocontroladores de nemátodos más efectivos a largo plazo. Por esta razón, se sugiere repetir el ensayo con mayor tiempo de incubación y también, de ser posible, en conjunto con *T. asperellum.*

Trichoderma es un género de hongos filamentosos perteneciente a la familia Moniliaceae, del orden Hyphales de la clase Hyphomycetes y la división Eumycota (Argumedo et al. 2009), descrito por Persoon en 1794, *Trichoderma* ha sido evaluado como biocontrolador de un importante grupo de patógenos de suelo, en el que se encuentran diferentes géneros de hongos y nemátodos. Entre los mecanismos de acción de *Trichoderma* para el control de nemátodos se ha reportado parasitismo directo de huevos y larvas mediante enzimas como proteasas y quitinasas; como también por medio de la inducción de los mecanismos de defensa de la planta (Mendoza et al. 2013). En varios estudios se describe a *Trichoderma* como un potencial biocontrolador de nemátodos (Chiriboga et al. 2015). Sin embargo, en la presente investigación las cepas de este género obtuvieron bajos porcentajes de mortalidad; *Trichoderma* TMV-51 (29 %) y *Trichoderma* TMV-10 (17 %).

Por su parte, *Penicillium* es un género de moho perteneciente a la familia Trichocomaceae, del orden Eurotiales de la clase Eurotiomycetes y la división Ascomycota, descrito por Link en 1809. Este género ha sido altamente estudiado debido a la acción antimicrobiana de algunas especies. Además, se ha evaluado su posible acción nematicida. En un estudio realizado por Varela et al. (2017) en el que evaluaron varias cepas de hongos, entre ellos *Penicillium* sp. no reportaron actividad nematófaga de este género. Sin embargo, en un estudio realizado por Ciarmela (2008) reporta actividad nematófaga de *Penicillium* sobre huevos de nemátodos. Según Dávila et al. (1999) algunas especies de *Penicillium* como *P. melinii* poseen la capacidad de degradar quitina, siendo esta una capacidad de degradación característica de hongos depredadores de nemátodos (Sagués et al. 2011). En la presente investigación el aislado de *Penicillium* sp. TMV-60 tuvo una tasa de mortalidad del 33 %. Sin embargo, si tuviera una tasa de mortalidad superior, no se recomiendarí su aplicación como biocontrolador puesto que este género ha sido reportado como uno de los principales patógenos de plantas durante la postcosecha de frutos cítricos y manzanas (Ballester 2017).

Por útltimo, *Chaetomium* es un género perteneciente a la familia de mohos Chaetomiceae, del orden Sordiales, clase Sordariomycetes de la división Ascomycota, descrito por primera vez por Kunze en 1817. Una de las características más evaluadas de *Chaetomium globosum* es la capacidad de actuar como antagonista frente a otros hongos fitopatógenos (Flores 2017). En un estudio realizado por Khan et al. (2019) en el que evaluaron los metabolitos nematicidas producidos por *C. globosum* mostraron que los metabolitos secundarios del hongo como la quetoglobosina A y B y la flavipina ayudan a la actividad nematicida, obteniendo porcentajes de mortalidad para *M. javanica* del 77,6 y 69,2 %. Sin embargo, este género de hongos también ha sido reportado como oportunista en humanos, estando involucrado en casos clínicos de peritonitis, lesiones cutáneas e incluso

ha sido causante de la contaminación de fluidos para diálisis debido a la producción de chaetoglobosinas A, B, C, D, E, F, G, J, K (Nielsen et al. 1999). En el presente estudio, *C. globosum* TMV-30 tuvo una tasa de mortalidad del 30 %.

Conclusiones

En este estudio se investigó la actividad nematófaga en diferentes cepas de hongos aislados de muestras de suelo de cultivos con aparente infección de nemátodos. Se encontraron y estudiaron los siguientes géneros de hongos: *Arthrobotrys, Paecilomyces, Pochonia, Trichoderma, Penicillium, Chaetomium y Mortierella.* Los resultados muestran que el género *Arthrobotrys* es uno de los más activos, con la cepa *A. oligosporus* TMV-59 siendo la más activa, con una tasa de mortalidad del 76%. Estudios previos también han mostrado que *A. oligospora* es un hongo con una alta actividad nematófaga. Los resultados de este estudio son similares a los obtenidos en otros estudios y apoyan la idea de que *Arthrobotrys* puede ser una herramienta efectiva para el control biológico de nemátodos.

La actividad biocontroladora de los microorganismos es cepa específica, por lo que es importante evaluar muchos aislados con el fin de encontrar cepas con las mejores cualidades para tal efecto.

Es importante encontrar aislados de diferentes ecosistemas de manera que se cuente con cepas efectivas que puedan adaptarse a condiciones agronómicas y pisos climáticos muy diversos y cultivos de diferente índole.

Recomendaciones

Se sugiere realizar un estudio en el que se busquen diferentes cepas y especies del género *Pochonia* y compararlas entre sí, pues como se ha mencionado antes, la eficacia nematófaga de cada hongo depende de la cepa. Además, se recomienda realizar pruebas de *Arthrobotrys* y *Pochonia* en conjunto.

También, como ya se mencionó se recomienda realizar los ensayos con mayor tiempo de incubación especialmente con *Paecilomyces lilacinus.*

Agradecimientos

Un gran agradecimiento al laboratorio de nematología y fitopatología de AGROCALIDAD por los conocimientos brindados y por permitir el uso de las instalaciones. Al laboratorio de micología de la PUCE-Nayón, quienes hicieron los análisis moleculares y por guardar las cepas de los hongos en criopreservación. Principalmente, a la empresa Kawsak S.A.S por el uso de instalaciones, el apoyo técnico y el financiamiento de la investigación.

Referencias Bibliográficas

Aceves MO, Rocha AJ, Navarro OA. 2015. Aislamiento, identificación y caracterización de hongos nematófagos depredadores nativos de Costa Rica. Brenesia. 83–84(January):22–29.

Agrios G. 2004. Plant pathology: Fifth edition. Fifth. Sonnack K, editor. Dana Dreibelbis.

Ainsworth G, Bisby G. 2008. Dictionary of the fungi.

Obtenido de: https://archive.org/details/dictionaryfungit00kirk.

Argumedo D, Alarcón A, Ferrera R, Peña J. 2009. El género fúngico Trichoderma y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Rev Int Contam Ambient. 25(4):257–269.

Ballester A. 2017. Búsqueda de factores de patogenicidad/virulencia en penicillium spp., patógeno postcosecha de frutos, por ana rosa balllester. Inst Agroquímica y Tecnol Aliment. Obtenido de: https://www.iata.csic.es/es/agenda/eventobusqueda-de-factores-de-patogenicidadvirulencia-en-penicillium-spp-patogeno-postcosecha.

Baral H, Weber E, Marson G. 2020. Monograph of orbiliomycetes (Ascomycetes) based on vital taxonomy.

Bustamante V, Ordoñez J. 2020. Estudio de la ocurrencia de nematodos en el cultivo de cacao (Teobroma cacao L) en la zona sur de la provincia del Guayas.

Cañón D, Sanabria S. 2017. Evaluación de la acción de los hongos *Paecilomyces lilacinus*, Trichoderma harzianum y Lecanicillium lecanii sobre el nematodo Globodera pallida Stone (Behrens) en plantas de papa variedad criolla galeras. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Obtenido de: http://repository.udca.edu.co:8080/bitstream/11158/764/1/Trabajo de Grado Tesis Escrito.pdf.

Cantillo K, Maury S, Vargas G. 2018. Microorganismos como biocontroladores de fitopatógenos en post cosecha de cítricos.

Castillo M, Medina J. 2014. Control biológico del nematodo agallador del tomate de mesa *Meloidogyne incognita* mediante aislamientos de hongos nematófagos nativos. Universidad Nacional de Loja. Obtenido de: http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/TESIS WILSON FERNANDO.pdf

Castillo T. 2022. Evaluación in vitro de hongos Hypocreales para el control de Pratylenchus ssp , Scutellonema ssp y Helicotylenchus ssp. 5807(2):107–112.

Chen ZX, Chen SY, Dickson DW, editores. 2004. Nematology advances and perspectives.

Chiriboga H, Gómez G, Gárces K. 2015. Trichoderma spp. Para el control biológico de enfermedades Ing. Biomass.:1–28. Obtenido de:

https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2647/BVE17038725e.pdf?sequence=1.

Ciarmela M. 2008. Efecto ovicida de hongos del suelo sobre huevos de Toxocara canis [Werner] Jhonston. Repos Univ Nac La Plata - Fac Ciencias Nat y Mus.:215.

Dávila L, Clímaco J. 2005. Evaluación biocontroladora de Arthrobotrys sp. y Paecilomyces sp. sobre Meloidogyne javanica in vitro y bajo condiciones de invernadero en crisantemo (Drendranthema. Agron Colomb. 23(1):91–101. Obtenido de: http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v23n1/v23n1a12.pdf.

Dávila M, Acosta N, Betancourt C, Negrón J. 1999. Capacidad quitinolítica de hongos aislados de suelos agrícolas infestados con el nematodo nodulador (Meloidogyne spp.) en Puerto Rico. J Agric Univ Puerto Rico. 83(3–4):189–199. doi:10.46429/jaupr.v83i3-4.3889.

Erazo Sandoval NS, Manzano Ocaña JC, Patiño Castillo BD. 2020. Caracterización Molecular de la Diversidad Fúngica de los Bosques Llucud y Palictahua: Potencialidades en Control Biológico/Molecular Characterization of Diversity Fungic of the Llucud and Palictahua Forests: Potential in Biological Control. KnE Eng. 2020:313–328. doi:10.18502/keg.v5i2.6249.

Flores J. 2017. Antagonismo in vitro de hongos endófitos para su uso en el biocontrol de enfermedades forestales. Rev Científica FAREM-Estelí.(23):58–71. Obtenido de: doi:10.5377/farem.v0i23.5475.

Gonzales Osorio EV. 2013. Evaluacion in vitro de hongos nematofagos sobre larvas L3 de nematodos gastrointestinales de bovinos. Obtenido de: https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/9802.

Goswami BK, Mittal A. 2004. Management of root-knot nematode infecting tomato by Trichoderma viride and Paecilomyces lilacinus. Indian Phytopath. 57(2):235–236. Obtenido de: http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.838.2462&rep=rep1&type=pdf.

Guzmán Ó. 2011. Importancia de los nematodos espiral, Helicotylenchus multicinctus (Cobb) Golden y H. dihystera (Cobb) Sher, en banano y plátano. Agronomia. 19(2):19–32. Obtenido de: http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia19(2)_3.pdf.

Guzmán Ó, Castaño J, Villegas B. 2012. Principales nematodos fitoparásitos y sintomas ocasionados en cultivos de importancia económica. Agronomía. 20(1):38–50. Obtenido de: http://agronomia.ucaldas.edu.co.

Hernández J. 2012. Distribución y utilización de plaguicidas directrices sobre la prevención y manejo de la resistencia a los plaguicidas. Obtenido de: www.fao.org/publications.

Hidalgo J. 2017. La situación actual de la sustitución de insumos agroquímicos por productos biológicos como estrategia en la producción agrícola: El sector florícola ecuatoriano. Universidad Andina Simón Bolivar.

Khan B, Yan W, Wei S, Wang Z, Zhao S, Cao L, Rajput NA, Ye Y. 2019. Nematicidal metabolites from endophytic fungus Chaetomium globosum YSC5. FEMS Microbiol Lett. 366(14):fnz169. Obetenido de: doi:10.1093/femsle/fnz169. https://doi.org/10.1093/femsle/fnz169.

Larriba E, Jaime MDLA, Carbonell-Caballero J, Conesa A, Dopazo J, Nislow C, Martín-Nieto J, Lopez-Llorca LV. 2014. Sequencing and functional analysis of the genome of a

nematode egg-parasitic fungus, Pochonia chlamydosporia. Fungal Genet Biol. 65:69–80. doi:10.1016/j.fgb.2014.02.002.

López Llorca LV, Jansson H-B. 2001. Biodiversidad del suelo : control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuad Biodivers.(6):12–15. Obtenido de: doi:10.14198/cdbio.2001.06.02.

Mendoza G, Wilson J, Colina J. 2013. Efecto de Trichoderma atroviride, Trichoderma harzianumy Trichoderma viridesobre huevos de Meloidogyne sp. en condiciones de laboratorio. Rebiolest. 1:65–71.

Mokbel AA, Alharbi AA. 2014. Suppressive effect of some microbial agents on root-knot nematode, “Meloidogyne javanica” infected eggplant. Aust J Crop Sci. 8(10):1428–1434. Obtenido de: https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.752520993373869.

Nicola L, Tosi S, Savini D. 2014. In vitro evaluation of nematophagous activity of fungal isolates. J Basic Microbiol. 54(1):1–5. Obtenido de: doi:10.1002/jobm.201200431.

Nielsen KF, Gravesen S, Nielsen PA, Andersen B, Thrane U, Frisvad JC. 1999. Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. Mycopathologia. 145(1):43–56. doi:10.1023/a:1007038211176.

Niu XM, Zhang KQ. 2011. Arthrobotrys oligospora: A model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. Mycology. 2(2):59–78. Obtenido de: doi:10.1080/21501203.2011.562559.

Peraza-Padilla W, Orozco-Aveces M, Esquivel-Hernández A, Rivera-Coto G, Chaverri-Fonseca F. 2011. Aislamiento e identificación de hongos nematófagos nativos de zonas arroceras de Costa Rica. Agron Mesoam. 22(2):233. Obtenido de: doi:10.15517/am.v22i2.11797.

Perry R, Moens M, editores. 2006. Plant Nematology.

Perry R, Moens M, editores. 2013. Plant Nematology. 2nd ed.

Piedra R. 2008. Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias. Tecnol en Marcha. 21(1):pág. 123-132. Obtenido de: http://www.tec-digital.itcr.ac.cr/servicios/ojs/index.php/tec_marcha/article/view/1345.

Restrepo S. 2018. Evaluación del hongo Paecilomyces lilacinus, el bio-estimulante Agro-Mos® y el nematicida fluopyram para el control del nematodo nodulador Meloidogyne incognita en plantas de plátano (Musa paradisiaca cv. "Curaré enano") en invernadero. Obtenido de: https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6338/1/CPA-2018-T049.pdf.

Sagués M, Purslow P, Fernández S, Fusé L, Iglesias L, Saumell C. 2011. Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. Rev Iberoam Micol.:143–147.

Sikora R, Coyne D, Hallman J, Timper P, editores. 2018. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. 3rd ed.

Singh UB, Sahu A, Sahu N, Singh RK, Renu S, Singh DP, Manna MC, Sarma BK, Singh HB, Singh KP. 2013. Arthrobotrys oligospora-mediated biological control of diseases of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) caused by Meloidogyne incognita and Rhizoctonia solani. J Appl Microbiol. 114(1):196–208. Obtenido de: doi:10.1111/jam.12009.

Stirling G. 2014. Biological control of plant-parasitic nematodes: soil ecosystem management in sustainable agriculture. 2nd ed.

Talavera M. 2003. Manual de Nematología Agrícola.

Treviño Cueto DA. 2015. Hongos nematófagos del género Arthrobotrys spp., en el control de Meloidogyne Incognita bajo condiciones in vitro. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Triviño C, Navia D, Velasco L. 2013. Guía para reconocer daño en raíces y métodos de muestreo y extracción de nemátodos en raíces y suelo.

Uribe M, Muñoz JE, Riascos D. 2020. Los nemátodos: Microorganismos con múltiples funciones en los cultivos. Palmira.

Varela-Benavides I, Durán-Mora J, Guzmán-Hernández T. 2017. Evaluación in vitro de diez cepas de hongos nematófagos para el control de Meloidogyne exigua, Meloidogyne incognita y Radopholus similis. Rev Tecnol en Marcha. 30(1):27. Obtenido de: doi:10.18845/tm.v30i1.3062.

Vargas H. 2008. Identificación, cuantificación, caracterización y dinámica poblacional de nematodos en el cultivo de arroz (Oryza sativa) en el cantón de Upala, región Huetar norte de Cost Rica. Instituto tecnológico de Costa Rica sede regional San Carlos. Obtenido de: https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/3974/Identificación%2C cuantificación%2C caracterización y dinámica poblacional de nemátodos en el cultivo de arroz %28Oryza sativa%29 en el cantón de Upala%2C Región Huetar Norte de Costa Rica..pdf?s.

Vieira ÍS, Oliveira I de C, Freitas SG, Campos AK, Araújo JV de. 2020. Arthrobotrys cladodes and Pochonia chlamydosporia in the biological control of nematodiosis in extensive bovine production system. Parasitology. 147(6):699–705. Obtenido de: doi:10.1017/S0031182020000098.