



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL
CARRERA DE INGENERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO EXPERIMENTAL

**CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMÁTODO FORMADOR DE AGALLAS
MELOIDOGYNE SPP. MEDIANTE METABOLITOS PRODUCIDOS POR
BACTERIAS EXTREMÓFILAS**

*Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de
Ingeniero (a) en Biotecnología*

AUTORES:

ANGIE MICHELLE BRUNES MONTESDEOCA
CARLOS ANDRÉS FLORES NORIEGA

TUTORES:

MSc. JAIME ALBERTO NARANJO MORAN
Mg. MARCOS XAVIER VERA MORALES

GUAYAQUIL - ECUADOR

2024

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, **Angie Michelle Brunes Montesdeoca** con documento de identificación N° 095302424-7 y **Carlos Andrés Flores Noriega** con documento de identificación N° 0952707750; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



Angie Michelle Brunes Montesdeoca

C.I.: 095302424-7



Carlos Andrés Flores Noriega

C.I.: 0952707750

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, **Angie Michelle Brunes Montesdeoca** con documento de identificación N° 095302424-7 y **Carlos Andrés Flores Noriega** con documento de identificación N° 0952707750, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **“CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMÁTODO FORMADOR DE AGALLAS MELOIDOGYNE SPP. MEDIANTE METABOLITOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS EXTREMÓFILAS”**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero/a en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



Angie Michelle Brunes Montesdeoca

C.I.: 095302424-7



Carlos Andrés Flores Noriega

C.I.: 0952707750

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Jaime Alberto Naranjo Morán** con documento de identificación N° 0927155226, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “**CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMÁTODO FORMADOR DE AGALLAS MELOIDOGYNE SPP. MEDIANTE METABOLITOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS EXTREMÓFILAS**”, realizado por **Angie Michelle Brunes Montesdeoca** con documento de identificación N° 095302424-7 y **Carlos Andrés Flores Noriega** con documento de identificación N° 0952707750, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



Ing. Jaime Alberto Naranjo Morán, MSc.

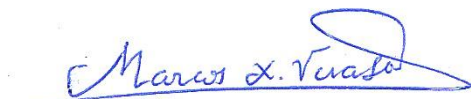
C.I.: 0927155226

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Marcos Xavier Vera Morales** con documento de identificación N° 0930412747, investigador del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “**CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMÁTODO FORMADOR DE AGALLAS *Meloidogyne* spp. MEDIANTE METABOLITOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS EXTREMÓFILAS**”, realizado por **Angie Michelle Brunos Montesdeoca** con documento de identificación N° 095302424-7 y **Carlos Andrés Flores Noriega** con documento de identificación N° 0952707750, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



Blgo. Marcos Xavier Vera Morales, Mg.

C.I.: 0930412747

I. DEDICATORIA

Agradezco profundamente a mis padres Katty Montesdeoca y William Brunes, sin ellos nada de este proceso sería posible, dedico mi tesis principalmente a ustedes. Han sido mi guía he inspiración, mis ganas de avanzar, siempre he querido ser como ustedes y estoy lográndolo, gracias a sus enseñanzas.

Gracias y mil veces gracias a mis queridos hermanos Karina, Jeremy y Nina por ser un soporte en mi vida, por estar para consolarme por cada caída, por sanar cada lágrima, por acompañarme en cada desvelada y brindarme su incondicional apoyo.

Gracias a la memoria de mí abuelito Cristóbal, a mí abuelita, por cada palabra de aliento, por ser mi ser una guía espiritual hacia Dios, estoy segura de que tus oraciones me han alcanzado he iluminado mi camino.

A mí tía Erika, a mi tía Puchy, a mi abuelita Lorena, por depositar su confianza en mí y darme palabras de aliento para seguir en este proceso.

Agradezco a Jorge, por ser una pieza fundamental en mi vida, por estar junto a mí en estos momentos importante. También a mí estimado profesor Jaime Naranjo, por demostrarme que los buenos profesores con amor a la docencia aún existen.

No hay palabras que permitan demostrarles mi agradecimiento, pero puedo decir que este logro es de mí familia y con orgullo puedo decir que soy ingeniera gracias a todas estas personas que sumaron a mi vida, profundamente gracias a todos ustedes.

Con amor y admiración hacia todos ustedes,

Angie.

II. DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico principalmente a mi madre, la persona que desde el día que nací me ha apoyado, querido y brindado todos los recursos necesarios para poder crecer tanto como en el aspecto personal como en el académico. Para la persona que ha sido mi modelo que seguir y a quien le estaré eternamente agradecido por lo que día a día hace por mí.

A mis hermanos Daniela, Mathías y Sofía, a quienes les guardo mucho cariño por siempre estar para mí, haciéndome compañía y hacer que olvide cualquier problema que llegara a tener con alguna de sus locuras, así sea por un corto período de tiempo.

También está dedicado para mi abuelita Rita, quien desde muy pequeño ha cuidado de mí e impulsado a seguir estudiando hasta convertirme a un profesional como espero hacerlo ahora. A mi tía Anita por su apoyo y cariño incondicional. Y por último a mi abuelo Miguel, quien a pesar de que ya no se encuentra más en este mundo estoy seguro de que se sentiría muy orgulloso al saber que logré graduarme de mi carrera como ingeniero.

Sin más que decir, agradezco nuevamente a todos mis familiares mencionados por esa red de apoyo que necesito cada vez que paso por alguna dificultad en el transcurso de mi vida. Este trabajo es gracias a y para ustedes. Los amo.

Carlos Flores.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro profundo agradecimiento a todas las personas que contribuyeron en el desarrollo y culminación de nuestra tesis, especialmente a nuestros tutores de tesis, MSc. Jaime Alberto Naranjo Morán y Mg. Marcos Xavier Vera Morales piezas fundamentales en el desarrollo de este proyecto de investigación, que brindaron sus conocimientos y su apoyo fue fundamental para completar esta experiencia de manera satisfactoria.

Nuestra gratitud al Instituto Oceanográfico y Antártico de la Armada del Ecuador (INOCAR) y al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) por su apoyo en la investigación. También quisiéramos hacer partícipe de este agradecimiento al Dr. Juan Manuel Cevallos, director del CIBE y a la Dra. María Fernanda Ratti Torres, directora del proyecto, por brindarnos los recursos necesarios para completar la investigación, además de contribuir significativamente en el desarrollo de este documento.

RESUMEN

El control eficaz de los nematodos fitoparásitos, como *Meloidogyne*, representa un desafío constante en la agricultura. En este estudio, se exploró el potencial de utilizar metabolitos secundarios producidos por bacterias psicrófilas aisladas de la región antártica como agentes de biocontrol contra *Meloidogyne spp.* Se realizó un exhaustivo proceso de aislamiento y caracterización de cepas bacterianas adaptadas a condiciones extremas de temperatura y nutrientes limitados. Posteriormente, se obtuvieron las soluciones que contienen metabolitos secundarios con actividad nematocida para realizar pruebas de bioensayo *in vitro*. Los resultados revelaron una notable capacidad de ciertas bacterias psicrófilas para producir compuestos bioactivos que afectan negativamente la supervivencia de *Meloidogyne spp.* Además, se identificó a nivel molecular todas las cepas bacterianas usadas en el bioensayo. Este estudio proporciona evidencia prometedora sobre el potencial de las bacterias psicrófilas antárticas y sus metabolitos secundarios como alternativas eco-amigables y sostenibles para el control de nematodos fitoparásitos en la agricultura. Estos hallazgos no solo abren nuevas vías para la investigación en biocontrol agrícola, sino que también resaltan la importancia de la biodiversidad microbiana en ecosistemas extremos como la Antártida.

Palabras clave: *Meloidogyne spp.*, nematodo, metabolitos secundarios, bacterias psicrófilas, Antártida, actividad nematocida.

ABSTRACT

Effective control of plant-parasitic nematodes, such as *Meloidogyne* represents a constant challenge in agriculture. In this study, the potential of using secondary metabolites produced by psychrophilic bacteria isolated from the Antarctic region as biocontrol agents against *Meloidogyne* spp. was explored. An exhaustive process of isolation and characterization of bacterial strains adapted to extreme temperature and nutrient-limited conditions was carried out. Subsequently, solutions containing secondary metabolites with nematicidal activity were obtained for *in vitro* bioassay tests. The results revealed a remarkable ability of certain psychrophilic bacteria to produce bioactive compounds that negatively affect the survival of *Meloidogyne* spp. In addition, all bacterial strains used in the bioassay were identified at the molecular level. This study provides promising evidence for the potential of Antarctic psychrophilic bacteria and their secondary metabolites as eco-friendly and sustainable alternatives for the control of plant-parasitic nematodes in agriculture. These findings not only open new avenues for agricultural biocontrol research, but also highlight the importance of microbial biodiversity in extreme ecosystems such as Antarctica.

Key words: *Meloidogyne* spp., nematode, secondary metabolites, psychrophilic bacteria, Antarctica, nematicidal activity.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo 1	1
Antecedentes	1
1.1 Introducción	1
1.2 Problemas de investigación.....	3
1.3 Delimitación.....	4
1.4 Pregunta de investigación.....	5
1.5 Objetivos	5
1.5.1 Objetivo general.....	5
1.5.2 Objetivos específicos	5
1.6 Hipótesis.....	6
Capítulo 2	7
Marco teórico	7
2.1 Biodiversidad microbiana de la Antártida.....	7
2.2 Bacterias psicrófilas	7
2.3 Nemátodo <i>Meloidogyne</i> spp.....	8
2.4 Ciclo de vida de nemátodos <i>Meloidogyne</i> spp.	8
2.5 Metabolitos primarios	8
2.6 Metabolitos secundarios.....	9
2.7 Electroforesis de ADN	10
2.8 Árbol filogenético	10
2.9 Bacterias psicrófilas en la agricultura	10
2.10 Información de especies	11
2.11 Compuestos producidos por <i>Pseudomonas</i> spp. con características nematicidas	12
Capítulo 3	14
Materiales y métodos	14
3.1 Materiales.....	14
3.2 Metodología de investigación	14
3.3 Población y muestra designada	14
3.4 Variables de investigación	15
3.4.1 Variable independiente	15
3.4.2 Variables dependientes	15
3.4.3 Variable de control.....	16
3.5 Procedimiento	17
3.5.1 Fase 1: Muestreo in situ.....	17

3.5.2	<i>Fase 1: Siembra e infección de Solanum lycopersicum L. con nemátodos de la familia Meloidogyne spp.</i>	18
3.5.3	<i>Fase 1: Preparación de los microorganismos y solución de metabolitos secundarios para el procedimiento experimental</i>	20
3.5.4	<i>Fase 1: Extracción de colonias puras de bacterias y su correcta obtención de metabolitos secundarios.</i>	23
3.5.5	<i>Fase 2: Identificación de bacterias y nemátodos.</i>	27
3.5.6	<i>Fase 3: Bioensayo, análisis de resultados e identificación molecular del nemátodo</i> 29	
Capítulo 4	31
Resultados y discusión	31
4.1	Análisis de secuencias del gen de ADNr 16S e identificación molecular de las bacterias.....	31
4.1.1	<i>Electroforesis para amplificación del gen ADNr 16S</i>	31
4.1.2	<i>BLASTn de las secuencias obtenidas e identificación de cada cepa</i>	32
4.2	Aislamiento e identificación molecular del nemátodo formador de agallas del género <i>Meloidogyne</i> spp. proveniente de plantas infectadas de cultivo de tomate <i>Solanum lycopersicum</i> L.	42
4.3	Evaluación de la tasa de mortalidad de nemátodos J2 inoculados en suspensiones de los metabolitos provenientes las bacterias psicrófilas.	43
4.3.1	<i>Porcentaje de mortalidad de cada una de las cepas (48 y 72 horas después de haber iniciado el ensayo) y sus implicaciones</i>	43
4.3.2	<i>Cálculo del TL₅₀ y su comparación con otros nematocidas de origen químico y biológico</i> 49	
Capítulo 5	50
Conclusiones y recomendaciones	50
5.1	Conclusiones	50
5.2	Recomendaciones.....	50
Bibliografía	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Punto de muestreo A y B de muestras recolectadas.	17
Figura 2. Muestras recolectadas de la Antártida, Isla Herradura.	18
Figura 3. Germinación de semillas de <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	18
Figura 4. Primer trasplante a maceteros.	19
Figura 5. Segundo trasplante a maceteros.....	19
Figura 6. Soporte de tomateras mediante ataduras.....	20
Figura 7. Infección de raíces de <i>Solanum lycopersicum</i> L. con masa de huevos de nemátodos.	20
Figura 8. Infección de plántulas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. con poblaciones puras de nemátodos.	21
Figura 9. Prueba de presencia de agallas en raíces.	22
Figura 10. Visualización de agallas en raíces de <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	22
Figura 11. Materiales usados para las extracciones de masas de huevo (A) y masa de huevo de <i>Meloidogyne</i> spp. en agalla (B).....	23
Figura 12. Proceso de obtención de poblaciones puras de nemátodos.....	23
Figura 13. Consorcio de bacterias en medio LB.	24
Figura 14. Aislamiento de colonias.....	25
Figura 15. Procedimiento de inoculación de las bacterias aisladas en medio LB.....	26
Figura 16. Metabolitos secundarios de bacterias extremófilas.....	26
Figura 17. Limpieza de secuencias a través de la aplicación GENEIOUS.	28
Figura 18. Identificación de nemátodos en agar agua con antibiótico.	29
Figura 19. Amplificación de ADN de las bacterias.	31
Figura 20. Distribución a nivel mundial de las presuntas especies identificadas según la secuencia de referencia.....	38
Figura 21. Árbol filogenético de bacterias psicrófilas.	41
Figura 22. Histograma del porcentaje de mortalidad (75-100%) durante las primeras 48 horas.	44
Figura 23. Histograma del porcentaje de mortalidad (50-75%) durante las primeras 48 horas.	45
Figura 24. Histograma del porcentaje de mortalidad (0-25%) durante las primeras 48 horas. ...	45
Figura 25. Histograma del porcentaje de mortalidad (75-100%) durante las primeras 72 horas.	47
Figura 26. Histograma del porcentaje de mortalidad (0-25%) durante las primeras 72 horas. ...	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Solanum lycopersicum</i> L.	11
Tabla 2. Taxonomía de nemátodo <i>Meloidogyne</i> spp.	11
Tabla 3. Compuestos nematicidas producidos por <i>Pseudomonas</i> spp.	12
Tabla 4. Parámetros para el termociclador.	27
Tabla 5. BLASTn de cepas aisladas y su identificación.	32
Tabla 6. BLASTn de la secuenciación del ADN del nemátodo aislado y su identificación.	42
Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de nemátodos (75-100%) 48 horas.	43
Tabla 8. Porcentaje de mortalidad de nemátodos (50-75%) 48 horas.	44
Tabla 9. Porcentaje de mortalidad de nemátodos (0-25%) 48 horas.	45
Tabla 10. Porcentaje de mortalidad de nemátodos (75-100%) 72 horas.	46
Tabla 11. Porcentaje de mortalidad de nemátodos (0-25%) 72 horas.	48
Tabla 12. Porcentaje de mortalidad y cálculo de TL50/TL95 para las especies que fueron sometidas a ambas fases.	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Germinación, trasplante y cuidado de las especies <i>Solanum lycopersicum</i> L.	59
Anexo 2. Selección de nemátodos e infección de las especies.	59
Anexo 3. Reactivación de muestras.	59
Anexo 4. Extracción de metabolitos secundarios de bacterias extremófilas.....	60
Anexo 5. Extracción, purificación y amplificación de ADN.	60
Anexo 6. Pesca de masas de huevos, desinfección y siembra en agar agua.	60
Anexo 7. Preparación de bioensayo.....	61
Anexo 8. Equipos de laboratorio usados durante la investigación.....	62
Anexo 9. Reactivos usados durante la investigación.	65
Anexo 10. Materiales usados durante la investigación.	67
Anexo 11. Diagramas de la metodología general y de cada fase del proyecto.	70

Capítulo 1

Antecedentes

1.1 Introducción

Los nemátodos formadores de agallas, en específico aquellos del género *Meloidogyne* son una de las principales plagas que atacan diversas especies de árboles, arbustos y plantas herbáceas (Alford, 2012). De acuerdo con el ciclo de vida de los nemátodos, estos son capaces de infectar plantas una vez logrado alcanzar el estadio juvenil 2 (J2) (Quevedo et al., 2022). *Meloidogyne* eclosiona en tierra, luego migra hacia las raíces de la planta y empieza a formar agallas en el tejido de la raíz, sitio donde se introducirán a la especie vegetal y se alimentarán de la misma (Youssef, 2023).

Existen distintos enfoques para combatir a esta plaga, sobre todo en plantaciones de especies vegetales destinadas a la alimentación humana (Naranjo et al., 2021). Desde tratamientos como el control químico (uso de sustancias químicas como fumigantes, organofosfatos, carbamatos, etc.), control de cultivos (rotación de cultivos, saneamiento, resistencia de las plantas huésped, solarización, fechas de siembra, cosecha, riego y enmiendas del suelo), control biológico (inoculación de microorganismos con propiedades nematicidas, de una especie específica, un consorcio o los compuestos nematicidas sin la presencia del microorganismo) (Ahmad et al., 2022).

El uso de sustancias químicas para controlar los nemátodos presenta una serie de desventajas en su aplicación, entre las cuales se encuentran los efectos negativos en organismos no objetivos, impacto ambiental, preocupación por la salud humana, desarrollo de resistencia, su nula biodegradabilidad, entre otras (Peiris et al., 2021).

Por otro lado, aunque los controles culturales han demostrado ser eficaces para reducir la población de nematodos y hongos fitopatógenos en cultivos sobre todo por la producción de amoníaco, los resultados suelen ser variados porque estas técnicas

dependen de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, así como de las enmiendas específicas utilizadas. Además, la eficacia de los métodos de control cultural también puede depender de la plaga o enfermedad específica que se quiera combatir (Oka et al., 2007).

El enfoque del control biológico ha demostrado su efectividad para el control y eliminar las poblaciones de nemátodos fitopatógenos (Vera-Morales et al., 2023).

Esto se debe los agentes de biocontrol (microorganismos o compuestos producidos por estos) siendo estos una gran opción debido a las siguientes características:

- Se dirigen a los organismos que desean controlar, lo que reduce los daños a los cultivos y los costes para los agricultores.
- Proporcionar una solución a largo plazo para las plagas de los cultivos, reduciendo la necesidad de medidas frecuentes de control de plagas en la explotación.
- No contaminan el medio ambiente, al menos al mismo nivel que los controles químicos (Mulusa, 2022).

La opción más viable es la de utilizar microorganismos con capacidades nematicidas (Quevedo et al., 2021). Existe una amplia gama de bacterias, hongos y otros microorganismos nematófagos que cumplen con estas características y mediante diferentes mecanismos bioquímicos (Vera-Morales et al, 2022).

Por su capacidad para prosperar en condiciones ambientales extremas, los microorganismos extremófilos han desarrollado estrategias de supervivencia únicas que producen enzimas y metabolitos secundarios específicos.

Estos compuestos desempeñan un papel crucial en el control biológico de patógenos, lo que hace que los extremófilos sean valiosos en prácticas agrícolas y aplicaciones biotecnológicas (Santos et al., 2021).

Con todos los antecedentes, se puede vislumbrar que es de vital importancia el hallar un control eficaz contra los nematodos formadores de agallas que atacan los cultivos de muchos agricultores, siendo la mejor opción microorganismos capaces de sobrevivir en condiciones extremas tales como muy elevadas o muy bajas temperaturas, como lo son bacterias extremófilas obtenidas de las muestras provenientes de la Isla Herradura, en la Antártida. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de los compuestos químicos producidos por las bacterias extremófilas contra el nemátodo formador de agallas *Meloidogyne* spp., en condiciones *in vitro*.

1.2 Problemas de investigación

Los productos utilizados para combatir nemátodos en plantaciones son tóxicos, con sus efectos adversos en la salud humana, especies vegetales, animales y ecosistemas.

El uso desproporcionado de productos químicos aplicados al suelo, afectan en la estabilidad de los ecosistemas, intervienen en las interacciones ecológicas y disminuyen la fertilidad de los suelos.

De acuerdo con Gowen, S. R., un miembro de FAO (Food and Agriculture Organization, un organismo perteneciente a la ONU), la demanda para controlar nemátodos fitopatógenicos cada vez incrementa debido a los daños que causan al sector agrícola. Por lo que, el uso de productos químicos es elegido como la única técnica posible o disponible para el agricultor, usando fumigantes o nematicidas como los organofosfatos y carbamatos.

Muchos de estos productos químicos están bajo uso restringido o prohibido. Por ejemplo, el bromuro de metilo es uno de los fumigantes comunes más peligrosos, debido a que se aplica bajo una lámina de polietileno. Este químico puede permanecer durante un tiempo prolongado en la superficie del suelo tratado, provocando efectos tóxicos a los siguientes cultivos. Finalmente, por acción de los microorganismos, estos compuestos

pueden degradarse y llegar a contaminar las aguas subterráneas, razón principal por la cual los nematicidas fumigantes y no fumigantes son prohibidos en varios países.

Los nematicidas químicos son compuestos tóxicos con valores de LD50 bastante bajos, lo que representa un peligro no solo para los agricultores que usan dichos compuestos químicos, así como también a cultivos adyacentes que pueden llegar a ser intoxicados. Lamberti et al., (2000) llevaron a cabo pruebas de tratamiento químico en cultivos de tabaco y melón Cantaloupe afectados por *Meloidogyne incognita* en el sur de Italia.

Un tratamiento de fumigación con metam potásico, metam sódico o 1,3-dicloropropeno (1,3-D 97), el metam potásico es conocido por sus propiedades inflamatorias y neurotoxicidad con cualquier organismo con el que llegara a tener contacto, también causa dermatitis alérgica y asma (Pruett et al., 2001).

1.3 Delimitación

Las bacterias utilizadas en el estudio fueron aisladas de muestras recolectadas con anticipación de la Isla Herradura, ubicada en la Península Antártica. Estos puntos de muestreo fueron seleccionados bajo el criterio de que, al haber vida vegetal y agua cerca de estos, existía una alta probabilidad de lograr hallar microorganismos autóctonos de la zona en los sustratos y sedimentos obtenidos allí.

Por cada zona de muestreo se tomaron tres réplicas de muestra, las cuales fueron almacenadas en fundas estériles con zip y almacenadas a bajas temperaturas (similares al de la zona de origen).

Para evaluar la actividad nematicida de las bacterias extremófilas obtenidas primero serán aisladas para tratar de obtener cultivos puros de cada especie de bacteria obtenida en las muestras, a continuación, se cultivará cada especie por separado para obtener la solución donde estén presente los metabolitos secundarios de cada bacteria, y por último

se usará dicha solución sobre nematodos en estado J2. Una vez terminado el proceso experimental, se determina la efectividad mediante el conteo de nematodos muertos, nematodos con la cutícula degradada y el número de huevos sin eclosionar.

Cabe recalcar que dicho proceso experimental se llevará a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) ubicado en el Km. 30.5 de la Vía Perimetral, en el Campus de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). En particular, se hará uso de los laboratorios pertenecientes al área de Fitopatología y el invernadero.

Para finalizar, el material vegetal donde se inocularán y crecerán los nematodos destinados a la experimentación serán plantas de *Solanum lycopersicum* L. (tomate) cultivadas y ubicadas en el invernadero del CIBE-ESPOL.

1.4 Pregunta de investigación

¿Es posible emplear compuestos derivados de bacterias extremófilas como control biológico de nemátodos formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.) en condiciones de laboratorio?

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Determinar el potencial de bacterias extremófilas (psicrófilas) como control biológico del nemátodo endoparásito pertenecientes al género *Meloidogyne*.

1.5.2 Objetivos específicos

- Aislar en medios de cultivos específicos e identificar a nivel molecular las bacterias extremófilas provenientes de la Antártida.
- Aislar e identificar molecularmente el nemátodo formador de agallas del género *Meloidogyne* spp. proveniente de plantas infectadas de cultivo de tomate *Solanum lycopersicum*.

- Evaluar la tasa de mortalidad de nemátodos J2 inoculados en suspensiones de los metabolitos provenientes las bacterias psicrófilas.

1.6 Hipótesis

Se espera que las bacterias extremófilas obtenidas en diferentes puntos de muestreo en la Isla Herradura ubicada en la Antártida poseen metabolitos secundarios con propiedades nematocidas contra los nemátodos pertenecientes al género *Meloidogyne* spp.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1 Biodiversidad microbiana de la Antártida

La Antártida es el continente con el promedio de humedad y temperatura más bajas de nuestro planeta, por lo que se ha convertido en una región de gran interés científico, especialmente en áreas como la microbiología, donde las investigaciones han sido enfocadas al estudio de la biodiversidad bacteriana y a la producción de compuestos con aplicaciones biotecnológicas (Domínguez, 2008).

Las características fisiológicas y metabólicas que han desarrollado los microorganismos existentes en la Antártida son el resultado de un proceso evolutivo durante miles de años, en un ambiente increíblemente extremo (Rogers, 2007).

En este laboratorio natural, los microorganismos se encuentran sometidos a condiciones estresantes (bajas temperaturas, aridez, escasa disponibilidad de nutrientes, alta salinidad y radiación UV). Estos factores contribuyen a la selección de microorganismos con características bioquímicas únicas (Muñoz et al., 2010).

2.2 Bacterias psicrófilas

El microbiota extremófilo conforma una población de microorganismos muy diversos, cuya característica más importante es la de poseer condiciones óptimas para su desarrollo muy diferentes a las que poseen los microorganismos considerados como normales, por ejemplo, crecer a valores altos o bajos de temperatura y pH, crecimiento en aguas con alta salinidad y presión osmótica, presencia en ambientes con alta presión y radiación, entre otros (Ramírez et al., 2016).

2.3 Nemátodo *Meloidogyne* spp.

Los nemátodos agalladores del género *Meloidogyne* son endoparásitos obligados con un rango de hospedantes que abarca más de 3000 especies de plantas (Abad et al., 2003).

Las especies del género *Meloidogyne* tienen una amplia distribución geográfica y causan considerables pérdidas en la producción de cultivos hortícolas, ornamentales, frutales e industriales (Ornat et al., 1999).

Meloidogyne puede ocurrir en un amplio rango de tipos de suelo, pero su asociación con daños a cultivos se refleja en suelos de textura gruesa (Guzmán et al., 2008).

Las especies del género *Meloidogyne* causan severos daños en las raíces, alteran el flujo de nutrientes en los tejidos de las plantas y retardan el crecimiento de las raíces, todo lo que puede contribuir a disminuir el rendimiento de la planta (Rodríguez et al., 2006).

2.4 Ciclo de vida de nemátodos *Meloidogyne* spp.

Saucet et al. (2016) afirma que:

Todas las *Meloidogyne* spp. tienen un ciclo de vida similar. Los huevos se depositan en masas gelatinosas y sobreviven en el suelo o en residuos vegetales. Los juveniles móviles de la segunda etapa (juveniles o J2) eclosionan de los huevos y se mueven hacia las puntas de las raíces. Durante la interacción compatible en plantas susceptibles, los J2 penetran la raíz y migran hacia abajo, entre las células de la corteza, hasta la región del meristemo apical. Luego se mueven hacia arriba en el cilindro vascular, induciendo células especializadas hipertrofiadas y multinucleadas que se alimentan conocidas como células gigantes (p. 1).

2.5 Metabolitos primarios

Una característica importante de las plantas es que realizan dos tipos de metabolismo: el primario y el secundario. El metabolito primario se lleva a cabo en las células de todos

los seres vivos y las sustancias producidas se llaman metabolitos primarios (Adeyemi, 2011).

Los metabolitos primarios de las plantas están implicados en su crecimiento, desarrollo y reproducción, mientras que los metabolitos secundarios juegan un papel muy importante en su adaptación ante el estrés ambiental y en la defensa frente a potenciales depredadores y patógenos (organismos que causan enfermedades) (Lustre, 2022).

Los metabolitos primarios son productos microbianos elaborados durante la fase exponencial de crecimiento cuya síntesis es una parte integral del proceso de crecimiento normal. Incluyen productos intermedios y finales del metabolismo anabólico, que la célula utiliza como componentes básicos de macromoléculas esenciales (p. ej., aminoácidos, nucleótidos) o se convierten en coenzimas (p. ej., vitaminas) (Sanchez et al., 2008).

2.6 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos derivados del metabolismo primario, pero de limitada distribución en el reino de las plantas restringidos a un grupo taxonómico particular (Shulpa et al., 2010).

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos con un complejo, estructura química y una variedad de funciones fisiológicas. Están obligados a implementar las estrategias de supervivencia de las bacterias en condiciones adversas, actuando como mediadores con el medio externo y medios de comunicación intercelular (Andryukov, et al., 2019).

Los metabolitos secundarios son una fuente de principios activos de medicamentos y de valiosos productos químicos, cuyas aplicaciones farmacéuticas se debe a su función como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antivirales, antitumorales, fungicidas, inmunoestimulantes, entre otras (Pérez et al., 2011).

El alcance de las posibles interacciones (antagónicas, sinérgicas, etc.) entre los microorganismos y otros sistemas vivos a través de sus metabolitos secundarios es enorme, y las mismas constituyen una fuente inagotable para la obtención de nuevos metabolitos activos (Brizuela et al., 1998).

2.7 Electroforesis de ADN

La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución. Por su parte, la electroforesis en geles de poliacrilamida, aunque tiene una mayor limitación en cuanto al tamaño de los fragmentos que podemos separar (5-600 pb), posee un poder de resolución mucho mayor, permitiendo la separación de moléculas que difieren en un sólo par de bases (Fierro, et al., 2014).

2.8 Árbol filogenético

La finalidad de los análisis filogenéticos es estimar una filogenia (árbol filogenético) que muestre la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio. Es decir, el objetivo final es un árbol filogenético que sea reflejo del proceso de evolución donde las entidades biológicas son el resultado de “descendencia con modificación” (Darwin, 1859).

2.9 Bacterias psicrófilas en la agricultura

El uso de una mayor cantidad de agroquímicos (en concentración, dosis o diversidad) ha provocado efectos deletéreos para el medio ambiente por contaminación de suelos y fuentes hídricas, para la salud humana por exposición directa y prolongada a los agroquímicos y para la biodiversidad de microorganismos e insectos benéficos para el cultivo, que son susceptibles a las moléculas que conforman el producto biocida y cuyas poblaciones se reducen como efecto secundario tras la aplicación del químico (Ab Rahman, 2018).

El uso de agentes biológicos es una opción económica y ecológica que puede constituir un componente importante en el manejo integrado de los nemátodos (Kumar et al., 2012). El objetivo central del uso de microorganismos biocontroladores es limitar la aplicación de agroquímicos disminuyendo la presencia del patógeno en el cultivo de una forma ecoamigable. Para ello, es necesario que el biocontrolador sea capaz de permanecer viable y crecer en el espacio de la planta susceptible a la presencia del fitopatógeno bien sea rizósfera, filósfera o endósfera (Vinchira et al., 2019).

2.10 Información de especies

Tabla 1. Taxonomía de *Solanum lycopersicum* L.

Reino	<i>Plantae</i>	Plantas
Subreino	Tracheobionta	Plantas vasculares
Superdivisión	Espermatofita	Plantas con semillas
División	Magnoliophyta	Plantas con flores
Clase	Magnoliopsida	Dicotiledóneas
Subclase	Astériidae	
Orden	solanales	
Familia	Solanáceas Juss.	Patata familia
Género	<i>Solanum</i> L.	solanáceas
Especies	<i>Solanum lycopersicum</i>	tomate de jardín
	L.	
Variedad	<i>Floradade</i>	

Fuente: USDA, s.f.

Se utilizó la variedad de tomate “Floradade” debido a que su factor de germinación del 95%, de crecimiento indeterminado, resistente a plagas y enfermedades de buenos rendimientos agrícolas (Reyes et al., 2018).

Tabla 2. Taxonomía de nemátodo *Meloidogyne* spp.

Reino	<i>Metazoos</i>
Subreino	Eucariota
Filo	Nemátodos
Clase	Cromadorea
Orden	Rabdítida

Suborden	Tylenchina
Infraorden	Tylenchomorpha
Superfamilia	Tylenchoidea
Familia	Meloidoginidae
Subfamilia	Meloidogininae

Fuente: NCBI, s.f.

2.11 Compuestos producidos por *Pseudomonas* spp. con características nematocidas

El efecto nematocida característico de la solución de metabolitos secundarios es debido a la presencia de compuestos capaces de degradar a los nematodos, sobre todo atacando su cutícula protectora. Si bien los compuestos de los metabolitos provenientes de las cepas usadas en este estudio no han sido identificados, la Tabla 11 muestra posibles candidatos que podrían ser los principales responsables del efecto nematocida de las bacterias psicrófilas aisladas, identificadas y evaluadas.

Tabla 3. Compuestos nematocidas producidos por *Pseudomonas* spp.

Nombre	Fórmula	Efecto	Referencias
Ácido 2-hidroxi-fenazina-1-carboxílico	2-(OH)-Phz-1-COOH	Fenanzina con propiedades antifúngicas y nematocidas. Es producido por <i>P. chlororaphis</i> GP72, RP-4, <i>P. aurantiaca</i> FS-2, ARS-38, <i>P. aeruginosa</i> PA14.	Liu et al. (2016) Shahid et al. (2017) Cezairliyan et al. (2013)
Pirrolnitrina	10H6Cl2N2O	Pirrol con propiedades antifúngicas y nematocidas producido por <i>P. chlororaphis</i> PA23. Su efecto tóxico está correlacionado con la inhibición del transporte de electrones	Nandi et al. (2015) Tripathi y Gottlieb, (1969) Wong y Airall, (1970)
Cianuro de hidrógeno	HCN	Compuesto volátil con propiedades antibacterianas, antifúngicas, fitotóxicas y nematocidas producido por <i>P. aeruginosa</i> PAO1, <i>P.</i>	Shahid et al. (2017) Wells et al. (2017) Zdor (2015)

		<i>aurantiaca</i> PB-St2, FS-2, ARS-38, <i>P. chlororaphis</i> RP-4. Actúa contra el nematodo mediante la pérdida de la función de la mitocondria debido a la inhibición de la citocromo c oxidas o la retención del Fe en las células, formando FeCN.	Rijavec et al. (2016)
2,4-Diacetylphloroglucinol	DAPG	Antibiótico producido por <i>P. fluorescens</i> con efecto nematicida en la incubación de huevos y no en J2. Diferentes resultados dependiendo de si se usa agua o metanol como solvente.	Meyer, S. L. et al. (2009)
Ácido acridínico-4-carboxílico	C ₁₄ H ₉ NO ₂	Compuesto aislado de <i>P. aeruginosa</i> con efecto antibiótico y nematicida. Fue probado su efecto en <i>Meloidogyne incognita</i> .	Zheng, X. et al. (2022)

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1 Materiales

Para realizar cada fase del proyecto, se usaron varios equipos, materiales y reactivos, a menudo reutilizando estos en las tres fases. En el **anexo 1** se enlista todo implemento usado por los investigadores para llevar a cabo el proyecto de tesis, adicionalmente se detalla su uso y se adjunta evidencia fotográfica de este.

3.2 Metodología de investigación

El enfoque de la investigación fue experimental, cualitativo y cuantitativo, pues se determina las bacterias extremófilas se emplearon como control biológico de *Meloidogynes* spp. observando si existe o no degradación en la cutícula del nemátodo, mientras que la efectividad como control biológico de dichas bacterias es cuantificado por el número de nemátodos afectados una vez realizado el proceso experimental.

En cuanto al proceso seguido en la investigación, este se dividió por fases habiendo un total de tres. La primera consistió en el aislamiento e identificación molecular de las bacterias psicrófilas obtenidas de muestras provenientes de la Antártida, la siguiente fase fue la preparación de las bacterias aisladas para extraer la solución con metabolitos secundarios (potencial nematicida) y los nemátodos que son necesarios para el procedimiento experimental, y para finalizar, la tercera fase consistió en la aplicación de dicha solución en los nemátodos para observar su reacción y analizar los resultados obtenidos usando software estadísticos.

3.3 Población y muestra designada

El presente trabajo tuvo como población de estudio las bacterias psicrófilas provenientes de la Antártida, específicamente en la Isla Herradura. Mediante un proceso de evaluación para determinar cuál de todas las bacterias recolectadas y aisladas poseen

un potencial nematicida y cuáles no, se determina la muestran, siendo aquellas capaces de metabolizar compuestos que degradan la cutícula de los nemátodos las seleccionadas como la muestra representativa de la población bacteriana.

3.4 Variables de investigación

3.4.1 Variable independiente

- **Especie bacteriana**

Una de las primeras y más importantes variables es la especie de bacteria usada para producir los metabolitos que se probaran como nematicida sobre *Meloidogynes* spp. Ya que, de los cultivos realizados por cada muestra obtenida, se aísla el mayor número de especies posibles y solo aquellas seleccionadas para formar parte de la muestra son usadas en el proceso experimental, lo que significa que usará una variedad de especies, teniendo cada una un efecto mayor o menor en combatir a los nemátodos comparándolas entre sí.

3.4.2 Variables dependientes

- **Tasa de mortalidad de los nemátodos J2**

Al tener propiedades nemáticas los metabolitos secundarios producidos por las bacterias, se esperaron que aquellos nemátodos con cutícula degradada eventualmente morirán, evitando que la planta de tomate se vea afectada por las agallas que estos microorganismos forman, lo que permite a la especie vegetal crecer en un estado relativamente estable y saludable (dependiendo del grado de efectividad de la bacteria usada).

Por ello, se evaluó el número de nemátodos muertos posterior al proceso experimental, pues este factor está directamente relacionado con la efectividad de la bacteria como control biológico, contrastando el número de nemátodos colocados (vivos)

al inicio del experimento con el número de nemátodos muertos luego de ciertos intervalos de tiempo una vez iniciado el proceso experimental.

3.4.3 *Variable de control*

- **Especie vegetal**

La especie seleccionada es *Solanum lycopersicum*, misma en la cual se inocularon, crecieron y se aislaron los nemátodos de prueba para el proceso experimental.

Siendo que previamente en el proceso de obtención de nemátodos se observó que los ejemplares de esta especie brindaron un entorno y sustratos propicios para el fitopatógeno para su crecimiento y desarrollo, se puede usar de igual manera para observar tres diferentes casos:

- **Control positivo:** ejemplar vegetal plantado y crecido sin intervención de microorganismo
- **Control negativo:** especie inoculada con nemátodos y sin aplicación de metabolitos secundarios
- **Tratamiento:** planta de tomate inoculada tanto con los ejemplares en estadio J2 como con la solución de metabolitos secundarios con potencial nematicidas
- **Herramientas digitales**

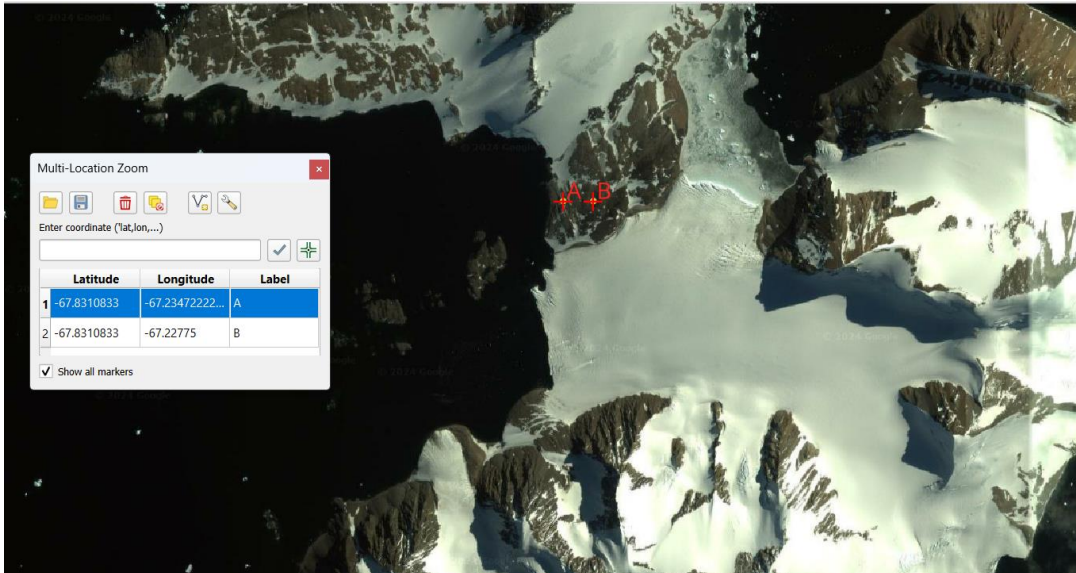
Para la realización de ciertas actividades especificadas dentro de la metodología se hará uso de softwares con un determinado uso, siendo estos:

- **Sitio web de la NCBI:** Busca de especies con un código genético similar a las bacterias obtenidas para su correcta identificación.
- **MEGA11:** Alineamiento de las secuencias obtenida y creación del árbol filogenético de las bacterias psicrófilas.
- **SPSS y R studio:** Análisis estadísticos de los resultados obtenidos en el proceso experimental.

3.5 Procedimiento

3.5.1 Fase 1: Muestreo in situ

Figura 1. Punto de muestreo A y B de muestras recolectadas.



Elaborado por: (Brunes y Flores, 2024)

Las muestras de las cuales se obtuvieron las bacterias fueron recolectadas de 19 puntos distintos de la Antártida, en la Isla Herradura. Por otra parte, por cada punto de recolección se tomó cuatro muestras. Para el presente estudio, solo se evaluaron las muestras A y B (Figura 1).

- **Preparación de muestras**

Una vez recolectada las muestras de sustrato y plantas, se las introdujo en bolsas con zipper, las cuales fueron enterradas en el suelo para mantenerlas en óptimas condiciones. Se mantuvo su almacenamiento y transporte hasta su llegada al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), las muestras se almacenaron dentro de un refrigerador con temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción de metabolitos secundarios.

Figura 2. Muestras recolectadas de la Antártida, Isla Herradura.



3.5.2 Fase 1: Siembra e infección de *Solanum lycopersicum* L. con nemátodos de la familia *Meloidogyne* spp.

- **Germinación de *Solanum lycopersicum* L.**

En bandejas de germinación se colocó tierra de sembrado con nutrientes TURBA BM2 humectada con anterioridad, en cada uno de los 10 pocillos se colocó una semilla de tomate de la variedad Floradade. El cultivo se regó luego de la siembra y se repitió el proceso cuando la tierra en la superficie se estaba seca.

Figura 3. Germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* L.



- **Primer trasplante de plántulas**

Una vez el proceso de germinación haya culminado (8 a 9 días), se colocó las plántulas en maceteros de 10 cm de profundidad permitiendo el crecimiento de las raíces y se regó las plantas cada vez que la superficie se encuentre seca.

Las plántulas se colocaron en los hoyos y se les adicionó tierra a 2 cm o 3 cm de la base de la plántula, lo que facilitó el crecimiento de las raíces (López, 2017).

Figura 4. Primer trasplante a maceteros.



- **Segundo trasplante de plántulas a maceteros**

Transcurridas dos semanas las plantas de tomate llegaron 15 cm de alto, se procedió con el segundo trasplante para el óptimo crecimiento de raíces y tallo. Las plantas fueron colocadas en maceteros de 40 cm de profundidad x 20 cm de ancho, se utilizó una mezcla de tierra de sembrado, arena, cascarilla de arroz y arcilla para asegurar el sistema de drenado de agua, por cada macetero se colocan tres plantas de tomate de la variedad Floradade.

Figura 5. Segundo trasplante a maceteros.



- **Soporte de las ramas de tomate**

Para evitar que las ramas se quiebren por el peso de estas, se realizó un soporte mediante el uso de cinta tomatera conectando el tallo a una viga garantizando estabilidad de la planta, los nudos quedaron sueltos para evitar el ahogamiento.

Figura 6. Soporte de tomateras mediante ataduras.



3.5.3 Fase 1: Preparación de los microorganismos y solución de metabolitos secundarios para el procedimiento experimental

De plantas previamente infectadas con nemátodos de la familia *Meloidogyne* spp. se tomó una masa de huevos correspondiente a una sola especie de nemátodos (desconocida). Para esto, se tomó un segmento de la raíz de la planta infectada donde se pueda evidenciar la presencia de agallas. En las mismas raíces donde se encontraron las agallas se extrajeron las masas de huevos de los nematodos y se colocó en plantas de tomate (germinadas previamente en pocos días) en una maceta pequeña junto con tierra de sembrado y la cantidad adecuada de agua.

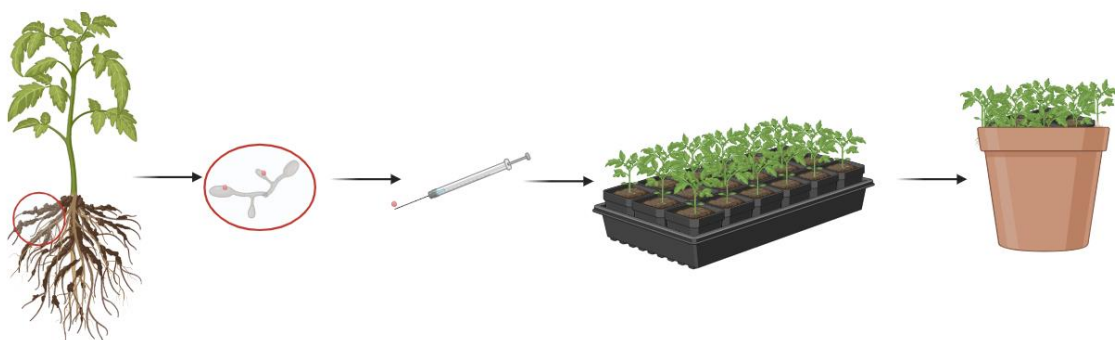
Figura 7. Infección de raíces de *Solanum lycopersicum* L. con masa de huevos de nemátodos.



Se dejó pasar un período aproximado de dos semanas tanto para el crecimiento de la planta de tomate ya infectada, nuevos ejemplares de *Solanum lycopersicum*, el desarrollo y reproducción de los nemátodos.

Luego de las dos semanas, se revisó la planta infectada en busca de más masas de huevo de nemátodos para infectar otras macetas con plantas. Se repitió el proceso, en cual con ayuda de jeringas se extraen las masas presentes en la raíz con agallas de la planta. Esta vez se prepararon cuatro macetas más en las cuales se introdujo una cantidad equivalente de plantas de tomate, y en cada maceta se colocó una masa de huevos. Se volvió a sembrar más plantas de tomate para que estas crezcan en el tiempo que se reproducen los nemátodos recién inoculados.

Figura 8. Infección de plántulas de *Solanum lycopersicum* L. con poblaciones puras de nemátodos.



Elaborado por: (Brunes y Flores, 2024)

Posterior a un período de tiempo considerable (entre 2 a 3 semanas) se mueven las plantas de cada pocillo de la bandeja de germinación a una maceta grande previamente llenada con tierra de sembrado humectada, para que estas puedan crecer sin inconvenientes cuidando de no perder las masas de huevo que presentan las plantas infectadas, se reparte de manera equitativa las plantas de tomate ya germinadas en bandejas de germinación.

Luego de dos semanas de la infección, con el uso de guantes para evitar contaminación cruzada se realizó la exploración de raíces superficiales mediante la búsqueda de agallas en raíces como prueba de la infección.

Figura 9. Prueba de presencia de agallas en raíces.



- **Recolección, desinfección e inoculación de masas de huevo de nematodos en agar agua**

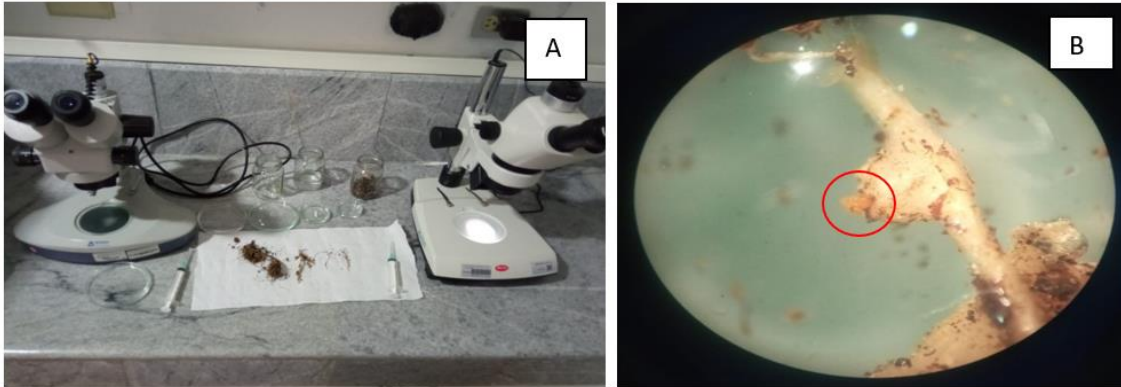
Tres días previo a la realización del bioensayo se recolectaron las masas de huevo presentes en las raíces con agallas en las plantas de tomate infectadas. Para esto se tomaron raíces afectadas con agallas hasta el laboratorio.

Figura 10. Visualización de agallas en raíces de *Solanum lycopersicum* L.



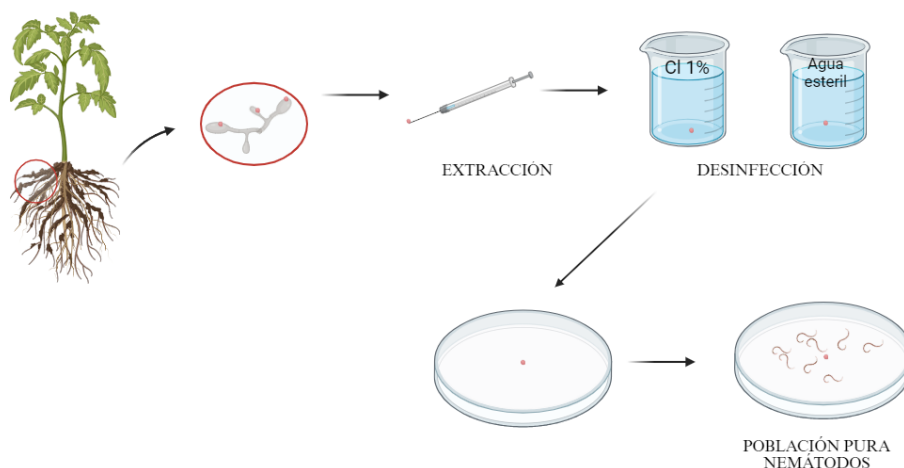
Las raíces se cortaron en trazos manejables con ayuda de un bisturí, luego se colocaron en agua en una placa de Petri de vidrio para su visualización en el estereoscopio. Con ayuda de dos jeringas se retiraron las masas de huevos encontradas en las agallas de las raíces.

Figura 11. Materiales usados para las extracciones de masas de huevo (A) y masa de huevo de *Meloidogyne* spp. en agalla (B).



Estas masas de huevo fueron puestas en otra placa de Petri de vidrio más pequeña para someterlas a un proceso de desinfección. Se necesitó de una solución de cloro al 1% (100 mL) y agua estéril (100 mL). Con ayuda de una tela, se sumergieron las masas de huevo en cada una de las soluciones durante dos minutos. Una vez se han desinfectado las masas, estas son inoculadas en cajas Petri con agar agua e incubadas a 28 °C hasta su posterior eclosión y uso en el bioensayo.

Figura 12. Proceso de obtención de poblaciones puras de nemátodos.



Elaborado por: (Brunes y Flores, 2024)

3.5.4 Fase 1: Extracción de colonias puras de bacterias y su correcta obtención de metabolitos secundarios.

- **Obtención de consorcios de bacterias en cultivo líquido**

Se preparó medio LB que será dispensado en viales de vidrio autoclavados con anticipación, se dispensó 9 mL de medio junto con 1 g de muestra obtenida en la Antártida, para obtener las bacterias en consorcio que puedan hallarse en las muestras.

Una vez dispensado el medio e inoculado los frascos se almacenó en Shaker durante 7 días a 10 °C manteniendo agitación constante.

Figura 13. Consorcio de bacterias en medio LB.



- **Dilución seriada de los medios líquidos inoculados y plaqueo para cultivo por agotamiento**

Posterior al período de incubación se realizó diluciones del medio inoculado hasta una concentración de 10^{-4} . Para esto se preparó 4 tubos con 9 mL de agua peptonada para cada tubo inoculado con muestras.

Se procedió, a inocular cada tubo con las muestras, se tomó 1 mL del medio y se dispensó (1) con el agua de peptonada, completando los 10 mL al mismo tiempo que se homogenizó la solución. Se repitió el mismo proceso con los 3 tubos restantes hasta llegar a la concentración deseada (10^{-4}).

De esta dilución se toman 50 μ L y fueron dispensado en una placa con medio TSA o agar nutritivo, para posteriormente, con ayuda de un asa Driglaski, esparcir la alícuota de medio diluido en toda la placa. Se repitió el proceso por cada uno de los tubos con

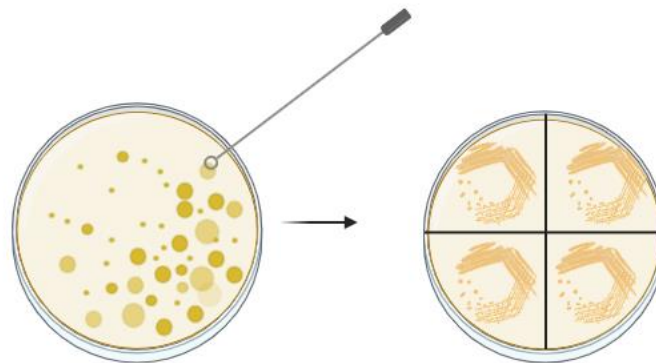
medio inoculado diluido. Las cajas de Petri que fueron inoculadas se dejan en incubación durante un período de 7 días a 10 °C.

- **Aislamiento de colonias puras**

Una vez concluido el período de incubación, se identificó colonias puras dentro de cada placa, por lo general distinguibles por su coloración o su distancia dentro de la misma placa. Se tomó con un asa de Kolle una pequeña muestra de cada colonia, la cual fue sembrada en una nueva caja de Petri con Agar Nutritivo dividida en cuatro cuadrantes por dos líneas perpendiculares (cada cuadrante corresponde a una bacteria).

Estas bacterias aisladas en cada cuadrante de la caja se dejaron durante un período de incubación de entre 2 a 3 días con constante agitación a 10°C.

Figura 14. Aislamiento de colonias.



Elaborado por: (Brunes y Flores, 2024)

- **Inoculación de las bacterias aisladas en medio LB**

Mediante el uso de un asa bacteriológica se tomó una sección de la bacteria aislada y se disolvió en frascos llenos con 10 mL de medio LB (Luria-Bertani) se utilizó un vial por cada bacteria aislada, posterior a la inoculación se dejó incubar los frascos durante 5 a 7 días a 10 °C en agitación constante para la obtención de los metabolitos secundarios.

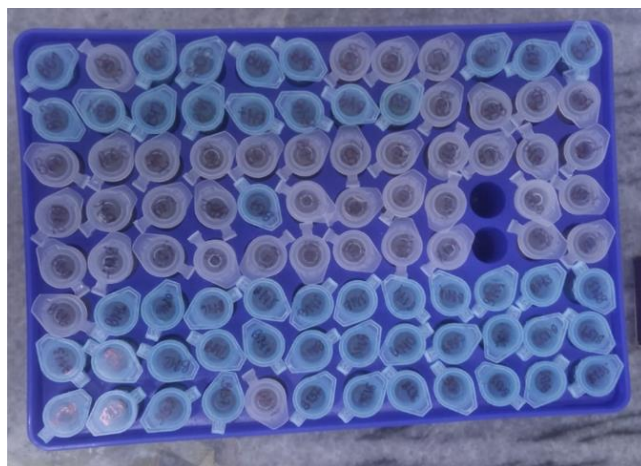
Figura 15. Procedimiento de inoculación de las bacterias aisladas en medio LB.



- **Obtención y almacenamiento de metabolitos secundarios**

Posterior al periodo de incubación, se retiró los frascos de la incubadora y se vació su contenido en tubos Falcon de 15 mL para someter estos a centrifugación (1500 RPM, 10 min a 4°C). Se descartó la parte sólida de la solución centrifugada y el sobrenadante se traspasó a otro tubo Falcon para una segunda centrifugación. Luego de que la solución haya sido sometida por segunda vez a los mismos parámetros, se repitió el proceso de descarte del precipitado, pero esta vez la solución se transfirió a tubos Ependorf de 1.5 mL llenando 3 de estos por cada tubo Falcon con metabolitos secundarios. Para finalizar, se almacenó los tubos que contienen los metabolitos en el refrigerados a -20 °C hasta su uso en el bioensayo.

Figura 16. Metabolitos secundarios de bacterias extremófilas.



3.5.5 Fase 2: Identificación de bacterias y nemátodos.

- **Extracción, PCR y secuenciación del material genético de los nemátodos aislados**

Para la elaboración de la PCR se utilizan 150 μL de ADN polimerasa dreamtaq, 6 μL de primer C2F3, 6 μL del primer 1108 y 138 μL de agua destilada, los cual se dispensó en tubos de centrifuga de 400 μL (Tigano et al., 2005).

Se utilizó una pluma de pato a la que se le hacen cortes con bisturí para obtener una punta que permita pescar los nemátodos, por su textura permite resbalar el mismo. Para la desinfección, se deja la pluma de pato por 2 minutos en cloro al 1% y luego en agua destilada por el mismo tiempo.

Se realizó una recolección de los nemátodos eclosionados de las masas de huevos aisladas en agar agua, y se colocó un nemátodo en cada tubo de 200 μL . Los tubos son colocados en el termociclador, de acuerdo con los parámetros:

Tabla 4. Parámetros para el termociclador.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
Desnaturalización	94	7	1
Hibridación - Extensión	94	1	35
	50	1	
	72	1	
Extensión final	72	10	1
Enfriamiento	10	-	-

Fuente: (Tigano et al., 2005)

- **Separación de moléculas mediante técnica de electroforesis**

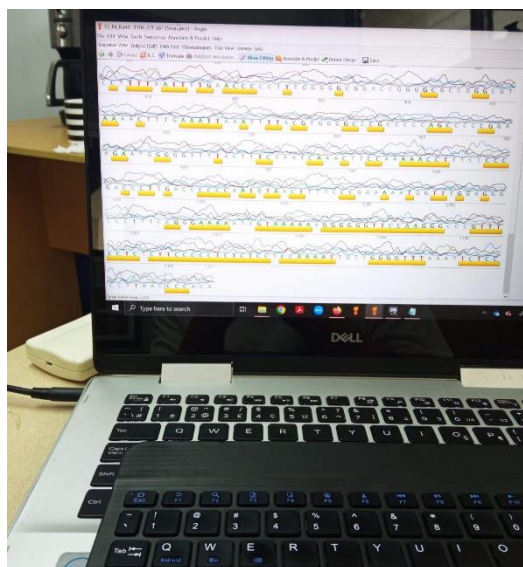
Se elaboró gel de agarosa utilizando 90 ml de TAE y 1.35 g de agar, se coloca el peine en el agar, el mismo debe gelificarse sin que tenga luz directa para evitar su degradación, por lo cual se cubre con papel aluminio.

El gel de agarosa se colocó dentro de la cabina, se rellenó con 1.5 L de TAE, se encendió la misma, se comprobó que las conexiones positivas y negativas tengan una correcta conexión, los parámetros de electroforesis utilizados fueron 145 Voltios durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, el agar se coloca en el transiluminador UV para su correcta lectura.

- **Limpieza y alineamiento de las secuencias para la construcción de un árbol filogenético**

Con ayuda del programa se realizó una “limpieza” de las secuencias de las bacterias, eliminando y corrigiendo ciertos pares de base que pudieran haber sido secuenciados de manera errónea ya sea por contaminación o por la naturaleza del proceso, también se descartó las secuencias que se consideraron con demasiados errores por contaminación al punto de que no pueden ser usadas para los siguientes pasos.

Figura 17. Limpieza de secuencias a través de la aplicación GENEIOUS.



Cuando se obtuvo las secuencias “limpias” se procedió a introducir las mismas en el software MEGA11 para realizar un alineamiento, pero no de las pares de bases sino de los aminoácidos traducidos para una mayor efectividad en el tratamiento. Para esto, se

seleccionó el programa de propósito general de alineación múltiple de secuencias “ClustalW”.

Para la elaboración del árbol filogenético se utilizó el mismo software y el archivo de las secuencias alineadas, donde con ayuda del algoritmo UPGMA se formó el árbol deseado a partir de la matriz de similitud por pares, también conocida como matriz de distancias, que describe las similitudes entre todos los pares posibles de UOT dadas (Hua et al., 2017).

3.5.6 Fase 3: Bioensayo, análisis de resultados e identificación molecular del nemátodo

- **Bioensayo**

Se realizó la inspección de las cajas de Petri con agar agua más antibiótico en las que se colocó masas de huevo, se verificó la eclosión de estos, se utilizó la pluma de pato para la pesca de los nemátodos y se seleccionó nemátodos con vitalidad, es decir, que cuando la pluma los toque tengan reacción de movimiento.

Figura 18. Identificación de nemátodos en agar agua con antibiótico.



Los Nematodos pescados se colocaron uno a uno en 20 μ l de agua esterilizada contenida en un tubo Ependorf de 1.5 mL. Una vez dentro de la solución se hayan colocado un total de 25 Nematodos, se procedió a añadir con ayuda de una micropipeta 8

µl de la solución de metabolitos secundarios. El proceso se repitió para la cantidad de cepas usadas en la presente investigación.

- **Toma de datos**

Antes del conteo se añadió NaOH 0.5 M a los tubos de centrifuga de 1.5 ml, permitiendo distinguir los nemátodos vivos y muertos, ya que los vivos se apiñaban al contacto y los rectos e inmóviles se definieron como muertos. Las observaciones de movilidad estuvieron determinadas por la frecuencia de movimiento de los nemátodos, los inmóviles se definieron como “-”, menos 5 veces cada 10 s se identificaron como “+” y los superiores como “++” (Yang et al., 2023).

- **Secuenciación, alineamiento y elaboración del árbol filogenético**

Se analizó y se realizó una “limpieza” de las secuencias de ADN del nemátodo, la misma se colocó en la aplicación del NCBI para identificar el organismo y obtener su nombre científico, se sometió a BLAST para obtener su porcentaje de identidad, junto con su NCBI code.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1 Análisis de secuencias del gen de ADNr 16S e identificación molecular de las bacterias

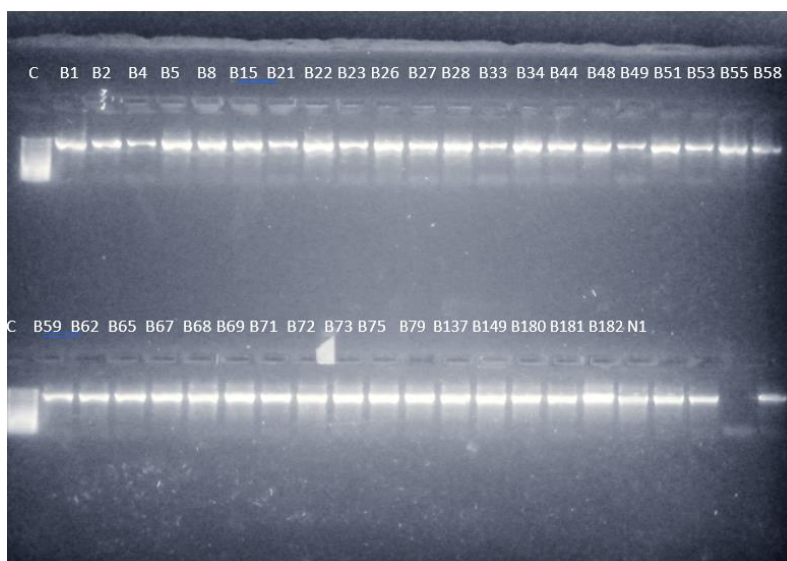
4.1.1 Electroforesis para amplificación del gen ADNr 16S

Para la correcta identificación de las especies a las que pertenecen las cepas bacterianas usadas en el presente estudio, se secuenció el gen 16S de cada una de estas. Pero antes de este proceso, se deben preparar las muestras para enviar a secuenciar puesto que se depende de una compañía externa para este paso, siendo esta empresa SOMAGEN.

Posterior al proceso de extracción y amplificación del ADN de las muestras por medio de una PCR, se realizó un corrido de las muestras en un gel de electroforesis para comprobar la presencia del gen en las muestras

. La Fig. 18 muestra el gel de agarosa con las respectivas ampliaciones de cada bacteria. Adicionalmente, se observó al final de la segunda fila la amplificación del gen 18S del nemátodo que también fue secuenciado para su posterior identificación.

Figura 19. Amplificación de ADN de las bacterias.



Elaborado por: (Brunes y Flores, 2024)

4.1.2 *BLASTn de las secuencias obtenidas e identificación de cada cepa*

Con ayuda de la *Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides* (BLASTn) se identificó a posibles candidatos correspondiente a la especie de las cepas usadas. En base a esto, se obtuvo la identificación de 12 tipos distintos de especies de bacterias. A continuación se enlista las especies identificadas junto al porcentaje de cepas que representan: *Psychrobacter arcticus* (5,41%), *Pseudomonas fluorescens* (24,32%), *Pseudomonas graminis* (2,70%), *Psychrobacillus glaciei* (2,70%), *Pseudomonas arsenicoxydans* (10,81%), *Pseudomonas mandelii* (2,70%), *Pseudomonas migulae* (16,22%), *Pseudomonas lini* (2,70%), *Pseudomonas yamanorum* (2,70%), *Pseudomonas caspiana* (2,70%), y *Pseudomonas cannabina* (5,41%). Adicionalmente se identificó el género al que pertenece el resto de las cepas, pero sin llegar a especificaciones de especie siendo todas estas *Pseudomonas sp.* (21.62%).

En la Tabla 5 se puede observar cada cepa junto a su respectivo código, además del porcentaje de identidad con respecto al mejor resultado de alineamiento. Por último, también se muestra el valor E y el código de la NCBI de cada secuencia de referencia.

Tabla 5. BLASTn de cepas aisladas y su identificación.

CÓDIGO CEPA	%ID	MEJOR ALINEACION	BASE DE DATOS (BLAST) NCBI code	VALOR E	NCBI code
B1	99.89 %	<i>Psychrobacter arcticus</i>	<i>Psychrobacter sp.</i> strain ANT_P45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	KF424828.1
B2	99.90%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas sp.</i> GLE121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	JX205210.1

B4	99.88%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain MLB-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	JX205210.1
B5	99.78%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain MLB-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	JX205210.1
B8	100,00%	<i>Pseudomonas graminis</i>	<i>Pseudomonas graminis</i> strain PgKB30 chromosome, complete genome	0,0	CP053746.1
B15	100,00%	<i>Psychrobacter arcticus</i>	<i>Psychrobacter arcticus</i> strain 273-4 16S ribosomal RNA, partial sequence	0,0	KF424828.1
B21	99.89%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain MLB-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	JX205210.1
B22	99.90%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain MLB-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	JX205210.1
B23	99.90%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain MLB-43 16S	0,0	JX205210.1

			ribosomal RNA gene, partial sequence		
			<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain		
B27	99.79%	<i>Pseudomonas sp.</i>	MLB-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	JX205210.1
			<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain		
B28	99.89%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MLB-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	JX205210.1
			<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain		
B33	99.89%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MLB-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	JX205210.1
			<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain		
B34	99.87%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MLB-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	JX205210.1
			<i>Psychrobacillus glaciei</i> strain PB01		
B44	100,00%	<i>Psychrobacillus glaciei</i>	chromosome, complete genome	0,0	CP031223.1
			<i>Pseudomonas arsenicoydans</i> strain		
B48	99.77%	<i>Pseudomonas arsenicoydans</i>	GTA8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MN911422.1

B49	100,00%	<i>Pseudomonas mandelii</i>	<i>Pseudomonas mandelii</i> strain JM25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MN758785.1
B51	100,00%	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain JM29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MN758789.1
B53	100,00%	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> strain m305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MK934431.1
B55	99,55%	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> strain GTA8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MK934431.1
B58	99,52%	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> strain m305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MK934431.1
B59	100,00%	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain JM29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MN758789.1
B62	100,00%	<i>Pseudomonas caspiana</i>	<i>Pseudomonas caspiana</i> strain Ba2SD-118 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MT373589.1

B65	99,00%	<i>Pseudomonas cannabina</i>	<i>Pseudomonas cannabina</i> strain PAMC 25172 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	KF528726.1
B67	100,00%	<i>Pseudomonas yamanorum</i>	<i>Pseudomonas yamanorum</i> strain 8H1 16S ribosomal RNA, partial sequence	0,0	NR_181528.1
B68	100,00%	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain JM29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MT555369.1
B69	100,00%	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain JM29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MT555369.1
B71	100,00%	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain JM29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MT555372.1
B72	99,41%	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain CRBJ3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	AF098464.1
B73	100,00%	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain JM29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MT555372.1

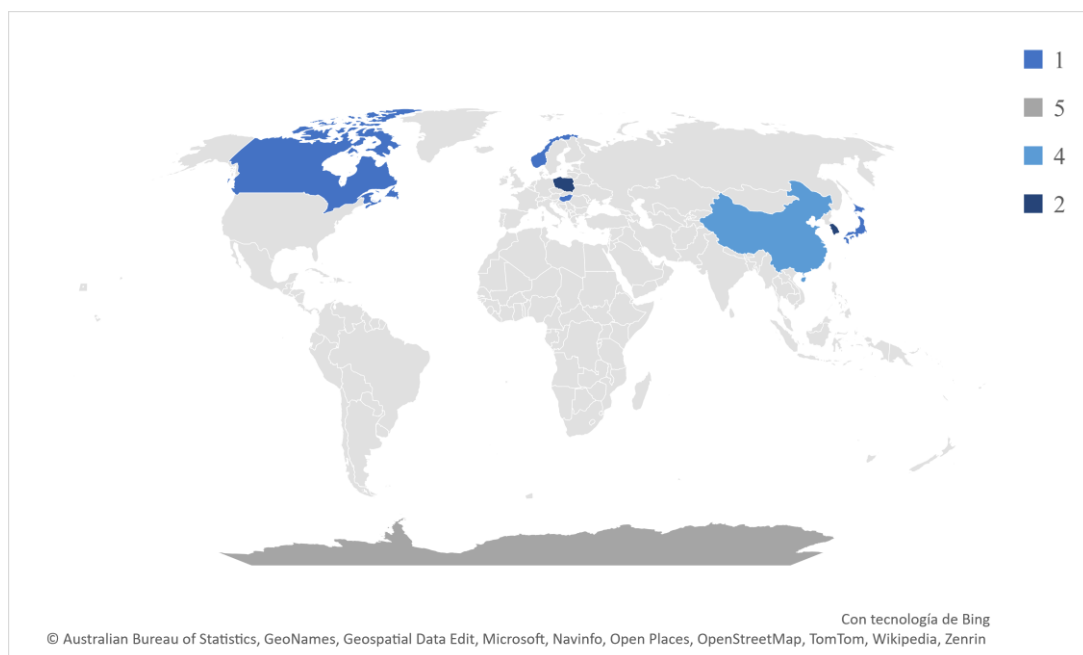
B74	99,77%	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain JM29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MT555372.1
B75	100,00%	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain JM29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MN758789.1
B79	99,79%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain MLB-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	KC542380.1
B137	99,90%	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain JM29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MN758789.1
B149	100,00%	<i>Pseudomonas cannabina</i>	<i>Pseudomonas cannabina</i> strain PAMC 25172 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	KF528726.1
B180	100,00%	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain JM29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MN758789.1
B181	100,00%	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i> strain JM29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MN758789.1

			<i>Pseudomonas</i>		
			<i>arsenicoxydans</i> strain		
B182	100,00%	<i>Pseudomonas</i>	m305 16S ribosomal	0,0	MK934431.1
		<i>arsenicoxydans</i>	RNA gene, partial		
			sequence		

Revisando cada una de las secuencias referencias y su información de donde proviene ayuda a tener una perspectiva de por qué se encontraron este tipo de especies en los puntos de muestreo elegidos, cuáles son las características que comparten y en que otras partes del mundo se han llegado a aislar e identificar.

La Figura 19 muestra la distribución a nivel mundial de las secuencias de referencias halladas usando BLASTn, dando una idea de los lugares donde se encuentran estas especies con más frecuencia.

Figura 20. Distribución a nivel mundial de las presuntas especies identificadas según la secuencia de referencia.



Elaborado por: (Brunes y Flores, 2024)

Con el anterior mapa se puede divisar que la zona de la que proviene el mayor número de especies referencias es la Antártida, al igual que las usadas en esta investigación. Con un total de cinco registros esta es la zona que registra la mayor

cantidad de secuencias referencia siendo las cepas identificadas: *Pseudomonas sp.* (MT555369.1 y MT555372.1) las cual son cepas obtenidas en condiciones y características de muestreo que *Pseudomonas sp.* (MT555369.1) con la única diferencia en que la muestra de suelo usada para estas cepas provenia de la Antártida; *Pseudomonas spp.* GLE121 (KC542380.1) una cepa de referencia psicrófila aislada de una muestra que se obtuvo de hielo superficial en una zona de ablación del Glaciar Ecológico ubicado en la Isla Rey George; *Pseudomonas yamanorum* (NR_181528.1), cepa aislada de muestras de tierra, específicamente suelo de la estación de la Gran Muralla Antártica; y por último está *Psychrobacillus glaciei* (CP031223.1), una cepa aislada de un iceberg en la Antártida y de la cual se logró secuenciar el genoma completa de la cepa.

Por otro lado, en China se hallaran especies tales como: *Psychrobacter arcticus* (KF424828.1) la cual se aisló de sedimentos de aguas profundas las cuales suelen mantener bajas temperaturas llegando a alcanzar los 15 °C en ciertas partes del año en las ciudades de China (*Water Temperature in Shenzhen in South China Sea Now*, s.f.); *Pseudomonas mandelii* (MN758785.1), *Pseudomonas migulae* (MN758789.1), *Pseudomonas lini* (MK880647.1 y MK880647.1), secuencia enviada por el Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Universidad Agrícola del Noreste, pero la información disponible no especifica el origen de la cepas aislada.

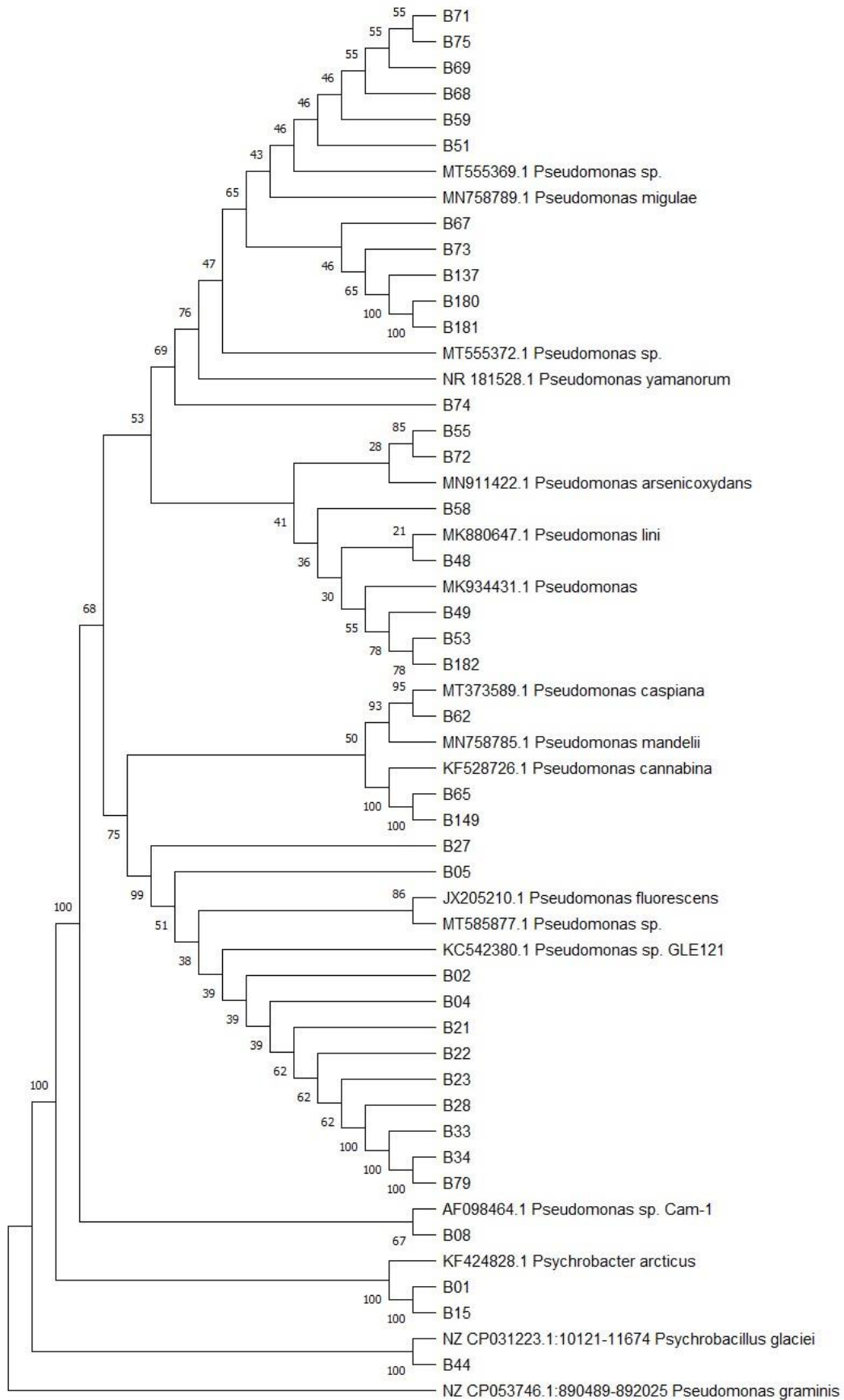
Corea del Sur cuenta con dos registros de las secuencias de referencia entre las cuales están especies como: *Pseudomonas graminis* (CP053746.1), cepa la cual se aisló de plantulas de ginseng que estaban infectadas con bacterias endófitas; y *Pseudomonas cannabina* (KF528726.1) aislada de una muestra de agua fresca de la cual se desconoce el punto exacto de muestreo. Otro país con la misma cantidad de registros que Corea del Sur es Polonia, donde se identificaron las especies: *Pseudomonas sp.* (MT585877.1) y

Pseudomonas arsenicoxydans (MN911422.1), aunque desafortunadamente se desconoce el origen de la muestra de la que se aisló ambas cepas.

Los países que solo cuentan con un registro son: Japón, con la cepa *Pseudomonas arsenicoxydans* (MK934431.1) de la cual se desconoce el punto exacto de muestreo; Hungría, donde *Pseudomonas caspiana* (MT373589.1) se aisló de una muestra tomada de las cuevas kársticas de este país, cuevas las cuales llegan a tener cuerpos de agua con temperaturas de hasta 10 °C (Muladi et al., 2013); En el polo opuesto al lugar donde se tomaron las muestras para la presente investigación también se halló una bacteria similar a una de las usadas, como lo es *Pseudomonas fluorescens* (JX205210.1) la cual es una de muchas bacterias pseudomonas identificadas en muestras tomadas de agujeros de criocanita en el archipiélago de Svalbard, entre Noruega y el Océano Ártico; para finalizar se encuentra Canadá, país del cual proviene la cepa: *Pseudomonas sp.* Cam-1 (AF098464.1), siendo esta una cepa que fue descubierta en un estudio de bacterias psicrófilas a partir de muestras de suelo de la zona Ártica.

Si hay algo que tiene en común las bacterias del que se conoce adecuadamente la ubicación de muestreo es que todas estas especies se hallaban en zonas con temperaturas muy bajas, lo que les brinda la cualidad de ser psicrófilas. Se deduce que, si bien se trata de puntos de muestreo que se encuentran muy distantes entre sí, la condición fundamental que se debe cumplir para suponer la presencia de este tipo de bacterias es una temperatura muy baja ya sea desde los 15 °C hasta temperaturas bajo 0 °C, sobre todo en las cepas bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas spp.* (91.89%).

Figura 21. Árbol filogenético de bacterias psicrófilas.



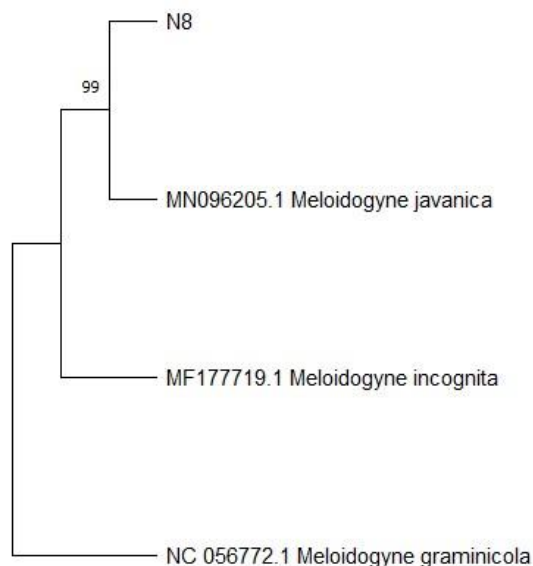
4.2 Aislamiento e identificación molecular del nemátodo formador de agallas del género *Meloidogyne* spp. proveniente de plantas infectadas de cultivo de tomate *Solanum lycopersicum* L.

Tabla 6. BLASTn de la secuenciación del ADN del nemátodo aislado y su identificación.

CÓDIGO	%ID	MEJOR ALINEACION	BASE DE DATOS (BLAST)	VALOR E	NCBI code
N1	99.87 %	<i>Meloidogyne javanica</i>	<i>Meloidogyne javanica</i> isolate M5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	MN096205.1

La secuencia sometida a BLAST, previamente obtenida de un ejemplar del nemátodo infectado, se alinea con 99.87% de identidad con la especie *Meloidogyne javanica*.

Figura 22. Árbol filogenético de especie *Meloidogyne* spp.



4.3 Evaluación de la tasa de mortalidad de nemátodos J2 inoculados en suspensiones de los metabolitos provenientes las bacterias psicrófilas.

4.3.1 Porcentaje de mortalidad de cada una de las cepas (48 y 72 horas después de haber iniciado el ensayo) y sus implicaciones

Los resultados del bioensayo aplicando los metabolitos secundarios de las bacterias muestran que las cepas usadas para combatir el nemátodo formador de agallas son efectivas.

La información que corrobora esto fue dividida en dos secciones, cepas que sus metabolitos se dejaron en contacto con los nematodos durante 48 horas y 72 horas.

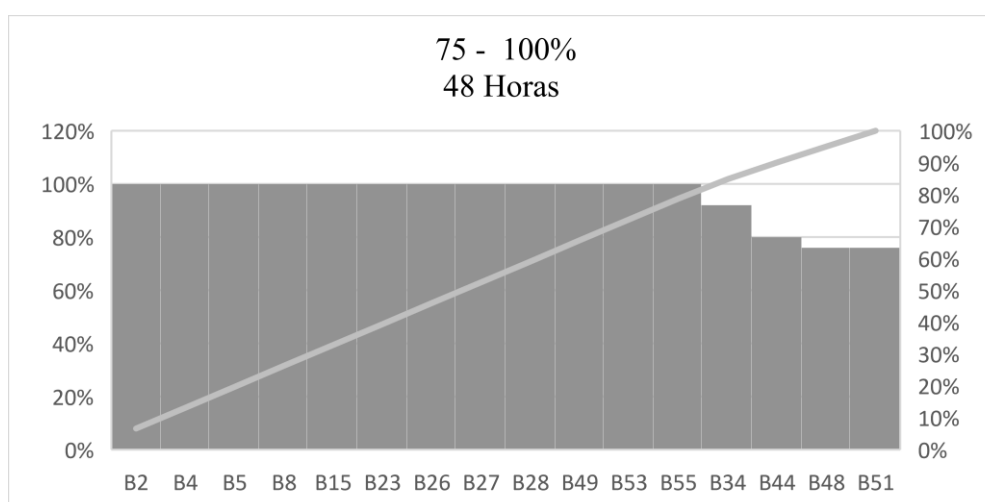
En cuanto a la primera sección, se tomaron 21 de las cepas que componen el estudio (B2 – B55). En la Tabla 7 se puede observar la efectividad de cada cepa según su porcentaje de mortalidad. El 57% de las bacterias de esta sección mostraron una tasa de mortalidad del 100%, lo que indica que más de la mitad de estas cepas tienen un muy alto potencial nematicida en poco tiempo. Un 19% de estas bacterias de igual manera muestra resultados prometedores ya que si bien la mortalidad no es tan elevada como las anteriores, los porcentajes siguen estando por encima del 75%, desde el 92% hasta el 76% de mortalidad (Figura 22).

Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de nemátodos (75-100%) 48 horas.

% MORTALIDAD 75 - 100%					
DESPUÉS DE LAS 48 HORAS					
CÓDIGO	ESPECIE BACTERIANA	GÉNEROS BACTERIANOS	VIVOS	MUERTOS	% MORTALIDAD
B2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%
B4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%
B5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%
B8	<i>Pseudomonas graminis</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%
B15	<i>Psychrobacter arcticus</i>	<i>Psychrobacter</i>	0	25	100%
B23	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%
B26	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%

B27	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%
B28	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%
B34	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	2	23	92%
B44	<i>Psychrobacillus glaciei</i>	<i>Psychrobacillus</i>	5	20	80%
B48	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	<i>Pseudomonas</i>	6	19	76%
B49	<i>Pseudomonas mandelii</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%
B51	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas</i>	6	19	76%
B53	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%
B55	<i>Pseudomonas lini</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%

Figura 23. Histograma del porcentaje de mortalidad (75-100%) durante las primeras 48 horas.

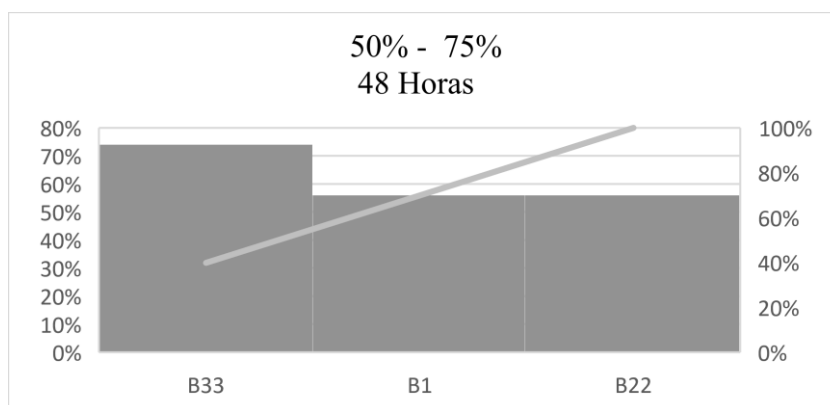


En cambio, el 14% de esta sección mostró un desempeño aceptable y un efecto nematocida notorio (Tabla 8), pero no muy efectivo, siendo que llegaban a tener resultados por debajo del 75% y cercanos al 50%. Si bien cumplen de cierta manera con el objetivo, los resultados no son los suficientes significativos para seguir siendo objetivo de estudio y usarlos posteriormente como un biocontrol para el fitopatógeno.

Tabla 8. Porcentaje de mortalidad de nemátodos (50-75%) 48 horas.

% MORTALIDAD 50 - 75%					
DESPUÉS DE LAS 48 HORAS					
CÓDIGO	ESPECIE BACTERIANA	GÉNEROS BACTERIANO	VIVOS	MUERTOS	% MORTALIDAD
B1	<i>Psychrobacter arcticus</i>	<i>Psychrobacter</i>	11	14	56%
B22	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	11	14	56%
B33	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	6	17	74%

Figura 24. Histograma del porcentaje de mortalidad (50-75%) durante las primeras 48 horas.

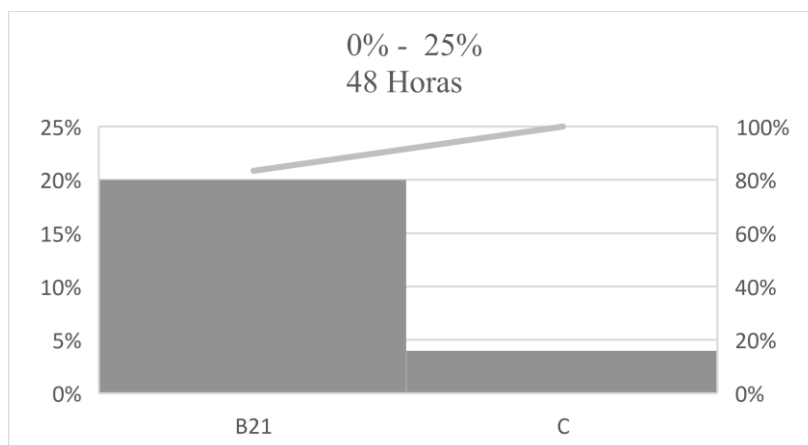


El último 10% de esta sección corresponde a aquellas cepas con un desempeño pobre o simplemente nulo, lo cual es esperado del control (C) pero se visualizó que la cepa B21 también exhibe una mortalidad muy inferior, con tan solo el 20% de nematodos muertos después de 48 horas de haber iniciado el tratamiento. Por lo cual esta última cepa se descarta por completo como posible control biológico.

Tabla 9. Porcentaje de mortalidad de nemátodos (0-25%) 48 horas.

% MORTALIDAD 0 - 25%					
DESPUÉS DE LAS 48 HORAS					
CÓDIGO	ESPECIE BACTERIANA	GÉNEROS BACTERIANO	VIVOS	MUERTOS	% MORTALIDAD
C	Control negativo	Control negativo	24	1	4%
B21	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	20	5	20%

Figura 25. Histograma del porcentaje de mortalidad (0-25%) durante las primeras 48 horas.



Para la segunda fase del proceso experimental se evaluó la tasa de mortalidad de los metabolitos secundarios de las cepas enlistadas en la Tabla 10 con la diferencia que el proceso se mantuvo durante 72 horas.

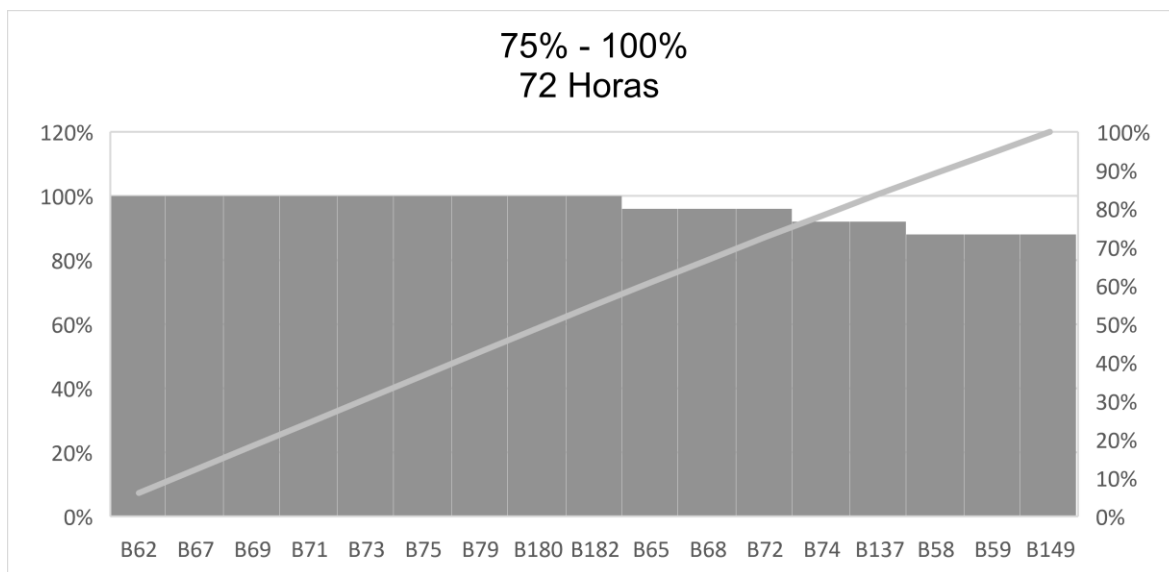
Para esta fase de 72 horas se hizo uso de 19 cepas bacterianas de las cuales se extrajeron sus metabolitos secundarios para probar su potencial nematocida. De estas 19 bacterias el 95% de ellas mostraron una mortalidad mayor al 75%, con el 47% de estas llegando al 100% de mortalidad, lo que demuestra que casi la mitad de las cepas de esta fase son capaces de eliminar por completo a los nematodos de manera similar a la fase de 48 horas, diferenciando solo en el tiempo de aplicación del tratamiento. Otro 47% de estas bacterias evidencian una tasa de mortalidad elevada de igual manera, pero sin llegar al 100% de mortalidad pero siendo estos mayor al 75% (Figura 24).

Tabla 10. Porcentaje de mortalidad de nemátodos (75-100%) 72 horas.

% MORTALIDAD 75 - 100%					
DESPUÉS DE LAS 72 HORAS					
CÓDIGO	ESPECIE BACTERIANA	GENEROS BACTERIANO	VIVOS	MUERTOS	% MORTALIDAD
B58	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	<i>Pseudomonas</i>	3	22	88%
B59	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas</i>	3	22	88%
B62	<i>Pseudomonas caspiana</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%
B65	<i>Pseudomonas cannabina</i>	<i>Pseudomonas</i>	1	24	96%
B67	<i>Pseudomonas yamanorum</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%
B68	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas</i>	1	24	96%
B69	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	25	100%

B71	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	0	25	100%
B72	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	1	24	96%
B73	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	0	25	100%
B74	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	2	23	92%
B75	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	0	25	100%
B79	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	25	100%
B137	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	2	23	92%
B149	<i>Pseudomonas cannabina</i>	<i>Pseudomonas cannabina</i>	3	22	88%
B180	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	0	25	100%
B182	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	0	25	100%

Figura 26. Histograma del porcentaje de mortalidad (75-100%) durante las primeras 72 horas.

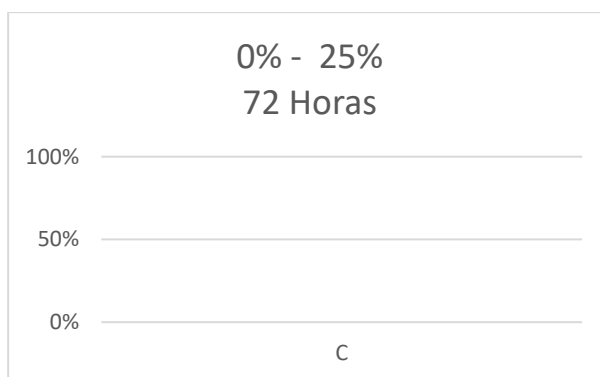


El último 6% de esta fase corresponde al tratamiento control que, al estar solo los nematodos con agua esterilizada se espera que ninguno de estos muera, al menos no por la influencia de compuestos nematicidas (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de mortalidad de nemátodos (0-25%) 72 horas.

% MORTALIDAD 0 - 25%					
DESPUÉS DE LAS 72 HORAS					
CÓDIGO	ESPECIE	GENEROS	VIVOS	MUERTOS	%
	BACTERIANA	BACTERIANO			MORTALIDAD
C	Control negativo		25	0	0%

Figura 27. Histograma del porcentaje de mortalidad (0-25%) durante las primeras 72 horas.



Los resultados obtenidos en este estudio son coincidentes con los obtenidos por Borrajo et al. (2020), siendo este un estudio donde se realizaron pruebas para medir el potencial nematicida de distintas rizobacterias, entre las cuales se encuentran las *Pseudomonas*, específicamente *Pseudomonas fluorescens*, una de las especies que representa una gran parte de las cepas usadas en este estudio. Además, el nematodo evaluado es *Meloidogyne javanica*, el nematodo identificado y usado en la etapa del bioensayo.

Ahora bien, los resultados de este ensayo evidencian que efectivamente, las bacterias del género *Pseudomonas* spp. son capaces de eliminar nematodos gracias a sus metabolitos secundarios, a pesar de que las bacterias del género *Bacillus* spp. muestran ser más efectivas a la hora de actuar como agentes de control biológico.

4.3.2 Cálculo del TL₅₀ y su comparación con otros nematocidas de origen químico y biológico

Tabla 12. Porcentaje de mortalidad y cálculo de TL₅₀/TL₉₅ para las especies que fueron sometidas a ambas fases.

Horas	Porcentaje de mortalidad			TL ₅₀ (h)	TL ₉₅ (h)
Especie	0 horas	48 horas	72 horas		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0%	75%	96%	1.86	2.79
<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	0%	80%	92%	2.16	2.82
<i>Pseudomonas migulae</i>	0%	76%	78%	1.96	3.11
<i>Pseudomonas</i> spp.	0%	85%	80%	3.61	5.42

Para el cálculo del tiempo letal medio (TL₅₀) se promedió los datos de cada especie que se repetía tanto en la fase de 48 como en la de 72 horas, además de hacer lo mismo a nivel de género, usando las *Pseudomonas* spp. que es la que más se repite entre ambas fases.

Posterior al cálculo de los promedios, se someten los datos de cada una de las especies y el género de bacterias a pruebas de Chi-cuadrado para la obtención de una línea de tendencia que explique la relación entre el tiempo y la tasa de mortalidad. Con la fórmula de la línea de tendencia reemplazando “y” por 0.5 (TL₅₀) y 0.95 (TL₉₅) se calculan los valores deseados.

Comparando los resultados obtenidos en este ensayo con los que se presentan en el estudio de Munguía et al. (2019) donde se evaluó y determinó el TL₅₀ de distintas sustancias nematocidas la que más destaca es el fluensulfone, compuesto químico que mostró un 100% de eficacia en la eliminación de ejemplares a las 2 horas, lo que es un valor de TL₅₀ menor a los que exhiben *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas migulae*, lo que indica que los metabolitos secundarios de estas bacterias no solo poseen los compuestos necesarios para poder degradar y eliminar los nematodos más rápido al momento de combatir los nematodos, haciéndolo en menos tiempo que nematocidas comerciales y convencionales.

Capítulo 5

Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- De las muestras aisladas de la Isla Herradura del continente Antártico, las 37 cepas bacterianas identificadas mediante técnicas de biología molecular correspondieron el 91.89% al género *Pseudomonas*, el 5.41% al género *Psychrobacter* y el 2.7% al género *Psychrobacillus*.
- Se obtuvo ejemplares de una sola especie de nematodos siguiendo el protocolo de infección y extracción de este microorganismo fitoparasitario, siendo la especie identificada molecularmente *Meloidogyne javanica* con un 99.87% de identidad.
- De los compuestos bioactivos provenientes de las bacterias psicrófilas evaluadas a las 48 horas el 57% mostraron una mortalidad del 100% de los juveniles de nematodos infectivos de estadio 2. Mientras que a las 72 horas el 75% de los compuestos resultaron eficientes en la mortalidad de los individuos de nematodos, llegando a tener una mortalidad del 95%.

5.2 Recomendaciones

- Las bacterias identificadas no son endémicas de la zona, sino del clima. Diferentes ejemplares con alta similitud genética a las cepas aisladas usadas en esta investigación se encontraban en lugares muy lejanos entre sí, pero tenían en común el estar presentes en ambientes con muy bajas temperaturas. Emplear dentro de los bioensayos otras especies de nematodos, tales como *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* y *M. hapla*. Además, ampliar los ensayos del laboratorio hacia el invernadero y campo.
- La mayoría de las bacterias psicrófilas provenientes de la Isla Herradura en la Antártida poseen propiedades nematocidas lo suficientemente buenas para ser

considero su uso como biocontrol contra *Meloidogynes* spp. Un tiempo elevado de exposición a lo solución de metabolitos aumenta las probabilidades de eliminar el 100% de la población de nematodos usados.

Bibliografía

- Ab Rahman, S. F. S., Singh, E., Pieterse, C. M., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102-111.
- Abad, P., B. Favery., M. N. Rosso, and P. C. Sereno. 2003. Pathogen profile root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction
- Adeyemi, M. (2011). A review of secondary metabolites from plant materials for post harvest storage. *International Journal of Pure & Applied Sciences & Technology*, 6(2), 94–102.
- Ahmad, S., Khan, M., & Ullah, I. (2022). Perspective Chapter: Integrated Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne*) Management Approaches. In *Parasitic Helminths and Zoonoses - From Basic to Applied Research*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102882>
- Alford, D. v. (2012). Miscellaneous Pests. In *Pests of Ornamental Trees, Shrubs and Flowers* (pp. 434–443). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398515-6.50004-5>
- Andryukov, B., Mikhailov, V., & Besednova, N. (2019). The biotechnological potential of secondary metabolites from marine bacteria. *Journal of Marine Science and Engineering*, 7(6), 176.
- Ball, M. M., Gómez, W., Magallanes, X., Rosales, R., Melfo, A., & Yarzabal, L. A. (2014). Bacteria recovered from a high-altitude, tropical glacier in Venezuelan Andes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 931-941.
- Borrajo, M. P., Mondino, E. A., Maroniche, G. A., Fernández, M., & Creus, C. M. (2022). Potential of rhizobacteria native to Argentina for the control of *Meloidogyne javanica*. *Revista argentina de microbiología*, 54(3), 224-232.

- Brizuela, M. A., García, L., Pérez, L., & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15(6974), 1998-15.
- Coelho, L. F., Couceiro, J. F., Keller-Costa, T., Valente, S. M., Ramalho, T. P., Carneiro, J., Comte, J., Blais, M.-A., Vincent, W. F., Martins, Z., Canário, J., & Costa, R. (2022). Structural shifts in sea ice prokaryotic communities across a salinity gradient in the subarctic. *Science of The Total Environment*, 827, 154286. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154286>
- Darwin C. 1859. On the Origin of Species by Means of Natural selection, or, the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. London
- Domínguez, Y., (2008). Bacterias antárticas y agentes antibacterianos. Boletín Antártico Chileno. Vol. 27. No.1. Punta Arenas, Chile.
- Dziewit, L., Grzesiak, J., Ciok, A., Nieckarz, M., Zdanowski, M. K., & Bartosik, D. (2013). Sequence determination and analysis of three plasmids of *Pseudomonas* sp. GLE121, a psychrophile isolated from surface ice of Ecology Glacier (Antarctica). *Plasmid*, 70(2), 254–262. doi:10.1016/j.plasmid.2013.05.007
- Feng, C., Zhang, G.-L., Wu, T.-T., & Kou, J. (2022). *Didymodon manhanensis* (Pottiaceae, Bryophyta), a new species from Inner Mongolia steppe, China and its phylogenetic position, based on molecular data. *PhytoKeys*, 197, 41–57. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.197.80531>
- Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 27.
- Guzmán-Plazola, R. A., Hernández-Flores, B., Franco-Navarro, F., & Cadena-Hinojosa, M. (2008). Nematodos agalladores en La Vega de Metztitlán, Hidalgo, México:

- Identificación, distribución espacial y relación con factores edáficos. *Nematropica*, 47-61.
- Hua, G.-J., Hung, C.-L., Lin, C.-Y., Wu, F.-C., Chan, Y.-W., & Tang, C. Y. (2017). MGUPGMA: A Fast UPGMA Algorithm With Multiple Graphics Processing Units Using NCCL. *Evolutionary Bioinformatics*, 13, 117693431773422. <https://doi.org/10.1177/1176934317734220>
- Jaramillo, J; Rodríguez, V; Guzmán, M; Zapata, M; Rengifo, T. 2007. Buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas (en línea). Manual técnico. CORPOICA-FAO-MAMA. Antioquia, Colombia. 314 p. Consultado 31 oct. 2015. Disponible en <http://www.fao.org.co/manualtomate.pdf>
- Kumar, V., Singh, A. U., & Jain, R. K. J. (2012). Comparative efficacy of bioagents as seed treatment For management of *Meloidogyne incognita* infecting okra. *Nematologia Mediterranea*, 40, 209-211.
- Lamovšek, J., Gregor, U. R. E. K., & Trdan, S. (2013). Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): microbes against the pests. *Acta Agriculturae Slovenica*, 101(2), 263-275.
- López Marín, L. M. (2017). Manual técnico del cultivo del tomate *Solanum lycopersicum*.
- Lustre Sánchez, H. (2022). Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista digital universitaria*, 23(2).
- Master, E. R., & Mohn, W. W. (1998). Psychrotolerant Bacteria Isolated from Arctic Soil That Degrade Polychlorinated Biphenyls at Low Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4823–4829. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.4823-4829.1998>
- Muladi, B., Csépe, Z., Mucsi, L., Puskás, I., Koltai, G., Bauer, M. (2013). Climatic features of different karst caves in Hungary.

- Mulusa, L. (2022). Biological Control of Root-Knot Nematodes Using *Trichoderma* Spp. In *Nematodes - Recent Advances, Management and New Perspectives*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99218>
- Munguía, A. M. G., Martínez, R. C., Barreto, C. R., Sato, M. P., Ferro, W. G., Cabrera, L. P., Martínez, A., & Munguía, C. a. G. (2016). Control biológico In Vitro de nematodos agalladores (*Meloidogyne* sp.) a base de quitosano y fluensulfone. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 4(1), 25–31. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v4i1.17>
- Muñoz, G.; Domínguez, M.; Hernández. & González, G., 2010. Biodiversidad bacteriana antártica: un desafío actual. *Boletín Antártico Chileno*. Vol. 29. No. 2.
- Naranjo-Morán, Jaime, Vera-Morales, Marcos, & Mora-González, Andy. (2021). Acumulaciones de hierro en agroecosistemas bananeros (Milagro, Ecuador): Una revisión bibliográfica de algunos factores que intervienen en la salud y nutrición del cultivo. *Siembra*, 8(2), e2680. <https://doi.org/10.29166/siembra.v8i2.2680>
- Oka, Y., Shapira, N., & Fine, P. (2007). Control of root-knot nematodes in organic farming systems by organic amendments and soil solarization. *Crop Protection*, 26(10), 1556–1565. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.01.003>
- Peiris, P. U. S., Xu, C., Brown, P., & Li, Y. (2021). Assessing the efficacy of alternative chemical and organic products against *Meloidogyne* spp. in sweetpotato. *Scientia Horticulturae*, 283, 110079.
- Pérez An y Jiménez E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Bioteología Vegetal*.
- Quevedo, A.; Vera-Morales, M.; Espinoza-Lozano, F.; Castañeda-Ruiz, R.; Sosa, D.; Magdama, F. Assessing the Predatory Activity of *Arthrobotrys oligosporus* Strain

- C-2197 as Biocontrol of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne* spp. *Bionatura* 2021, 6, 1586–1592.
- Quevedo, A.; Magdama, F.; Castro, J.; Vera-Morales, M. Interacciones ecológicas de los hongos nematófagos y su potencial uso en cultivos tropicales. *Sci. Agropecu.* 2022, 13, 97–108.
- Ramírez, G. M., Naranjo, C., Escobar, S., Araque, J., Djabayan, P., & Andueza, F. (2016). Microbiota extremofila y resistomas ambientales de la fuente termal “Termas La Merced” Quito-Ecuador. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, 1(2), 33-37
- Reyes-Pérez, J.J. et al. “Physiological, phenological and productive responses of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants treated with chitosan”. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 2018
- Rodríguez, M. G. (2006). Nematodos formadores de agallas en Sistemas de Cultivos Protegidos: Diagnostico y Manejo (Informe Final de Proyecto. Programa Ramal de Hortalizas -MINAG) (p. 171). La Habana: Laboratorio de Nematología CENSA.
- Rogers, D., 2007. Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. *Philosophical Transactions of the royal society*. Reino Unido.
- Sanchez, S., & Demain, A. L. (2008). Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *Microbial biotechnology*, 1(4), 283-319.
- Santos, A. P., Muratore, L. N., Solé-Gil, A., Farías, M. E., Ferrando, A., Blázquez, M. A., & Belfiore, C. (2021). Extremophilic bacteria restrict the growth of *Macrophomina phaseolina* by combined secretion of polyamines and lytic enzymes. *Biotechnology Reports*, 32, e00674. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00674>

- Saucet, S. B., Van Ghelder, C., Abad, P., Duval, H., & Esmenjaud, D. (2016). Resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in woody plants. *New Phytologist*, *211*(1), 41-56.
- Singh, P., Singh, S. M., & Dhakephalkar, P. (2014). Diversity, cold active enzymes and adaptation strategies of bacteria inhabiting glacier cryoconite holes of High Arctic. *Extremophiles*, *18*(2), 229–242. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0609-6>
- Tigano, M. S., Carneiro, R. M., Jeyaprakash, A., Dickson, D. W., & Adams, B. J. (2005). Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequences. *Nematology*, *7*(6), 851-862.
- Vera-Morales, M., Castañeda-Ruiz, R. F, Sosa, D, Quevedo, A., Naranjo-Morán, J., Serrano, L., & Ratti, M. F. (2022). Mecanismos de captura, colonización y alimentación empleados por parásitos y predadores de nematodos: *Ecosistemas*, *31*(3), 2390. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2390>
- Vera-Morales, M., López Medina, S. E., Naranjo-Morán, J., Quevedo, A., & Ratti, M. F. (2023). Nematophagous Fungi: A Review of Their Phosphorus Solubilization Potential. *Microorganisms*, *11*(1), 137.
- Vinchira-Villarraga, D. M., & Moreno-Sarmiento, N. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *21*(1), 2-5.
- Water temperature in Shenzhen in South China Sea now.* (n.d.). seatemperature.net. <https://seatemperature.net/current/china/shenzhen-guangdong-province-china-sea-temperature>
- Yang, X., Yu, H., Ren, J., Cai, L., Xu, L., & Liu, L. (2023). Sulfoxide-Containing Bisabolane Sesquiterpenoids with Antimicrobial and Nematicidal Activities from

the Marine-Derived Fungus *Aspergillus sydowii* LW09. *Journal of Fungi*, 9(3), 347.

Youssef Banora, M. (2023). Impacting of Root-Knot Nematodes on Tomato: Current Status and Potential Horizons for Its Managing. In *Tomato Cultivation and Consumption - Innovation, Sustainability and Health [Working Title]*. IntechOpen.

ANEXOS

Anexo 1. Germinación, trasplante y cuidado de las especies *Solanum lycopersicum* L.



Anexo 2. Selección de nemátodos e infección de las especies.



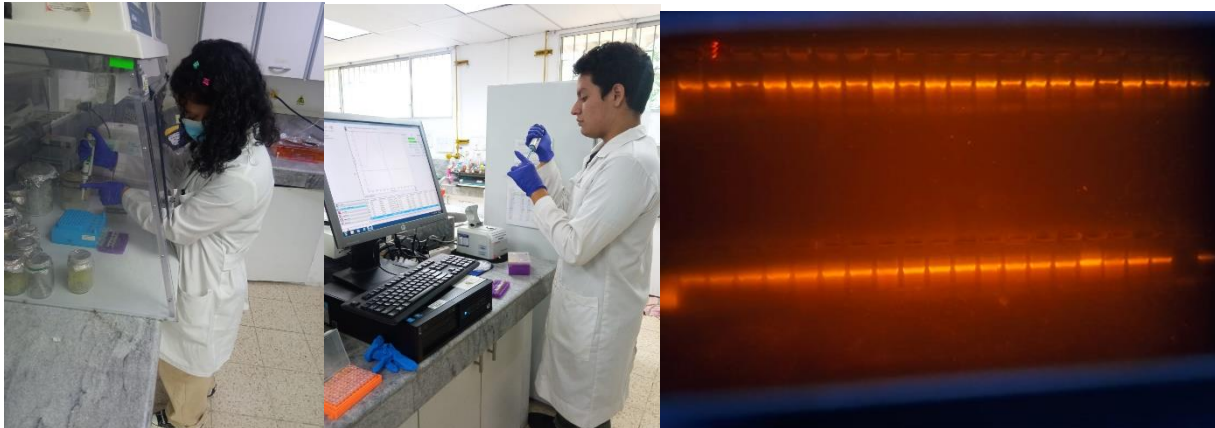
Anexo 3. Reactivación de muestras.



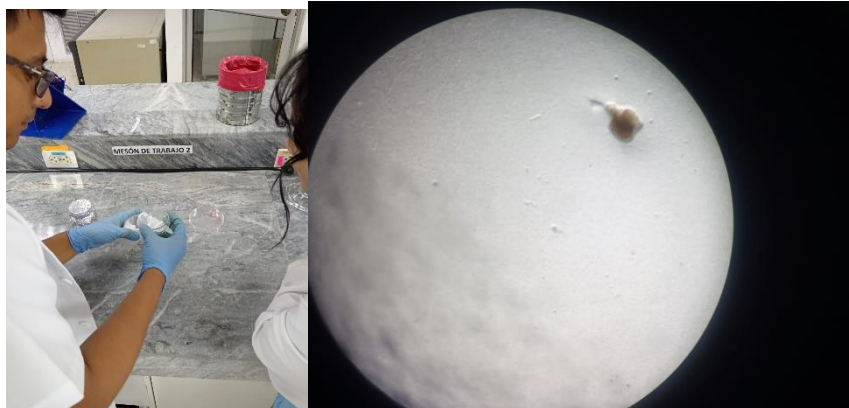
Anexo 4. Extracción de metabolitos secundarios de bacterias extremófilas.



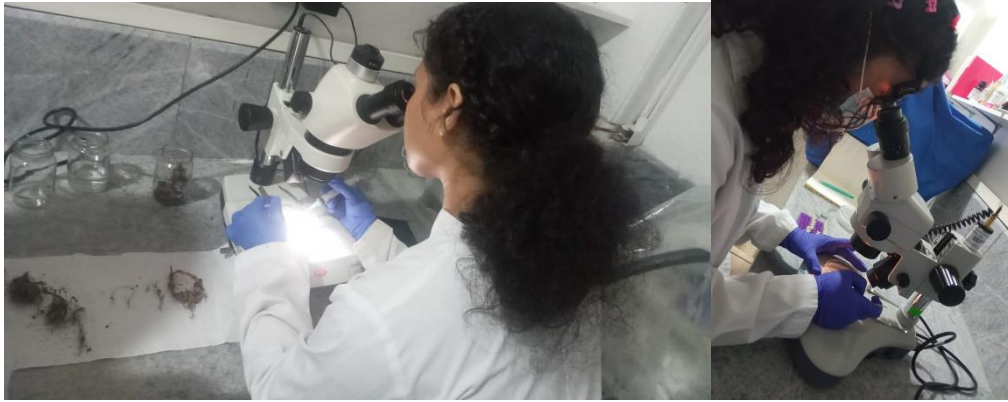
Anexo 5. Extracción, purificación y amplificación de ADN.



Anexo 6. Pesca de masas de huevos, desinfección y siembra en agar agua.



Anexo 7. Preparación de bioensayo.



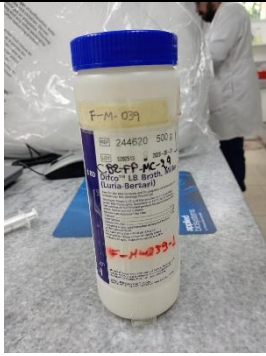
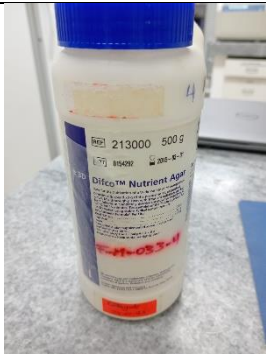

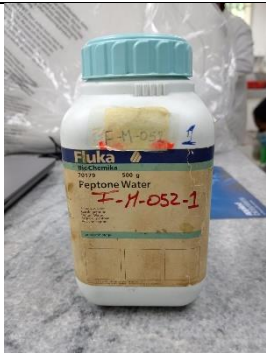
Anexo 8. Equipos de laboratorio usados durante la investigación.

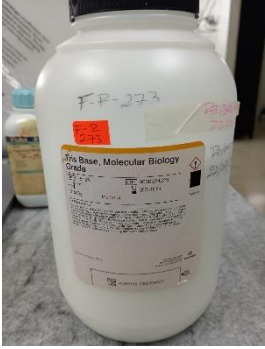
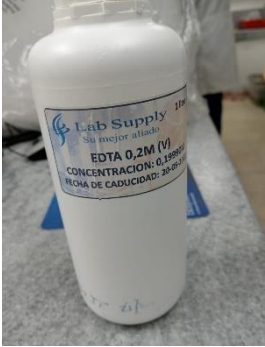
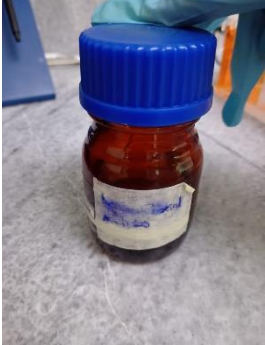
Equipos de laboratorio	Uso designado	Evidencia fotográfica
<p>Cámara de flujo con mechero a gas</p>	<p>Se utilizó para dispensar medios de cultivo en cajas de Petri en completa asepsia. Preparación de consorcio de bacterias en medio LB.</p>	
<p>Autoclave</p>	<p>Se realizó la esterilización de materiales e instrumentos para desarrollo de proyecto.</p>	
<p>Incubadora (bacterias extremófilas)</p>	<p>Se conservaron medios de cultivo y viales a 10° C temperatura.</p>	
<p>Incubadora (nemátodos)</p>	<p>Se realizó la conservación de nemátodos en cajas Petri con agar agua a 28°C.</p>	
<p>Refrigeradores (a dos temperaturas)</p>	<p>Se realizó la conservación de bacterias Antártida extremófilas a -20°C temperatura.</p>	

<p>Termociclador</p>	<p>Se realizó la lectura de la amplificación de la PCR realizada a la muestra de nemátodos.</p>	
<p>Sistema de electroforesis</p>	<p>Se utilizó la lectura de las bandas de las especies de bacterias y nemátodos.</p>	
<p>Centrífuga</p>	<p>Se utilizó para obtener el sobrenadante de las bacterias para la obtención de metabolitos secundarios.</p>	
<p>Estereoscopio</p>	<p>Se utilizó para visualización de masas de huevo y nematodos.</p>	
<p>Placa calentadora con agitador</p>	<p>Se utilizó para la elaboración del gel de agarosa para la electroforesis.</p>	

<p>Balanza</p>	<p>Se utilizó el equipo para pesar reactivos para la elaboración de medios de cultivo.</p>	
<p>Balanza analítica</p>	<p>Se utilizó el equipo para pesar cantidades exactas de reactivos para procedimiento de electroforesis.</p>	
<p>Nanodrop</p>	<p>Permitió evaluar las concentraciones adecuadas y pureza para la muestra de ADN.</p>	

Anexo 9. Reactivos usados durante la investigación.




Reactivos	Uso designado	Evidencia fotográfica
Medio LB (Luria Bertani)	Se utilizó el reactivo para la elaboración de medio líquido para cultivo de bacterias.	
Agar nutriente	Se utilizó el reactivo para la elaboración de medio de cultivo para el crecimiento de bacterias.	
Gel de agarosa	Se utilizó el reactivo para la elaboración del gel de agarosa para el equipo de electroforesis.	
Agua peptonada	Se utilizó el reactivo para realizar proceso de diluciones seriadas.	

<p>Tris Base</p>	<p>Se utilizó el reactivo para la elaboración de TAE para equipo de electroforesis.</p>	
<p>EDTA</p>	<p>Se utilizó el reactivo para la elaboración de TAE para equipo de electroforesis.</p>	
<p>Ácido glacial acético</p>	<p>Se utilizó el reactivo para la elaboración de TAE para equipo de electroforesis.</p>	

Anexo 10. Materiales usados durante la investigación.

Materiales	Uso designado	Evidencia fotográfica
Bolsas con zipper	Se utilizó para conservar las muestras extremófilas de tierra obtenida de la Antártida.	
Cajas Petri desechables	Se utilizó para cultivar y aislar las bacterias extremófilas.	
Asa Digralsky	Se utilizó para transferir el microorganismo de manera uniforme en el medio de cultivo.	
Asa Bacteriológica	Se utilizó para transferir el microorganismo en el medio de cultivo.	
Matraces Erlenmeyer	Se utilizó para medir volúmenes de sustancias para la preparación de medios de cultivo.	

<p>Micropipetas</p>	<p>Se utilizó para medir y transferir volúmenes.</p>	
<p>Maceteros</p>	<p>Se utilizó para la germinación de las semillas de tomate de la variedad Floradade.</p>	
<p>Tierra de sembrado TURBA BM2</p>	<p>Se utilizó tierra de sembrado con nutrientes para la germinación y siembra de plantas.</p>	
<p>Tubos (mL)</p>	<p>Se utilizó tubos para centrifugación.</p>	
<p>Frascos de vidrio con tapas de cierre hermético</p>	<p>Se utilizó para conservar las bacterias en medio LB.</p>	

<p>Tubos de centrifuga de 1.5 ml</p>	<p>Se utilizó para conservar los metabolitos secundarios extraídos.</p>	
<p>Jeringas</p>	<p>Se utilizó para la pesca y obtención de las masas de huevo obtenidos de las raíces de las plantas infectadas.</p>	
<p>NCBI</p>	<p>Base de datos que permitió conocer la identidad de las secuencias de las bacterias y nemátodos que se están investigando.</p>	

Anexo 11. Diagramas de la metodología general y de cada fase del proyecto.

