

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA

PROGRAMA DE CAPACITACIÓN Y TITULACIÓN PROFESIONAL



CEPAS DE *Bacillus* spp. EN EL CONTROL

DE *Meloidogyne* spp. EN CONDICIONES *in vitro*

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

TESISTA:

RICALDI MIRAVAL, Giannella Jessica Ingrid

ASESOR:

Ing. Vidal Jaimes, Edwin

HUÁNUCO – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía y apoyo en los momentos más difíciles.

A mis padres por su comprensión y ayuda incondicional en cada momento de mi vida.

A mi hijo Sebastián, por ser mi motivación para superarme cada día y a mi esposo Nino por todo su amor y paciencia.

AGRADECIMIENTO

Mi mayor gratitud a mi amiga y jefa la Blga. Mitsuyo García Wong, por su apoyo incondicional en el desarrollo de la presente tesis.

A mi asesor el Ing. Edwin Vidal Jaimes y a cada uno de los docentes del curso de PROCAPT de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán por su apoyo y asesoría para el desarrollo y culminación de la tesis.

Al Ing. Ángel Palomo, docente de la Universidad Nacional Agraria La Molina y el Ing. Cosme Quispe, encargado de área de Nematología del SENASA, por los conocimientos y experiencias transmitidas.

A la empresa INNOVAK GLOBAL por el financiamiento para el desarrollo de la tesis.

RESUMEN

En la búsqueda de alternativas biológicas para el control del nematodo *Meloidogyne* spp. se evaluó la actividad nematocida de cuatro cepas de *Bacillus* spp. sobre la emergencia de juveniles J2 de las masas de huevos, eclosión de huevos libres y movimiento de juveniles J2 en condiciones *in vitro*. Los tratamientos a base de *Bacillus thuringiensis* (10^7 UFC) y *Bacillus subtilis* (10^7 UFC) demostraron ser los más efectivos al inhibir en 95% y 91% la emergencia de juveniles de las masas de huevos respectivamente. En lo que respecta a la eclosión de huevos libres, todas las cepas demostraron inhibir la eclosión de huevos libres con un control de *Bacillus licheniformis* con 94%, *Bacillus thuringiensis* con 88%, *Bacillus amyloliquefaciens* con 88% y *Bacillus subtilis* con 82% de huevos no eclosionados y en la prueba de movimiento de juveniles J2 la cepa de *Bacillus subtilis* fue la única que logró suprimir el movimiento, con un 60% de juveniles afectados.

Palabras claves: *Meloidogyne*, *Bacillus*, emergencia, inhibir, eclosión, juveniles.

ABSTRACT

In the search for biological alternatives for the control of the nematode *Meloidogyne* spp. was evaluated the nematicidal activity of four strains of *Bacillus* spp. on the emergence of J2 juveniles of egg masses, hatching of free eggs and movement of J2 juveniles *in vitro* conditions. The treatments based on *Bacillus thuringiensis* (10^7 UFC) and *Bacillus subtilis* (10^7 UFC) demonstrated be the most effective in inhibiting the emergence of juveniles in 95% and 91% the egg masses respectively. Regarding the emergence of free eggs, all strains were shown to inhibit the hatching of free eggs with a control of *Bacillus licheniformis* with 94%, *Bacillus thuringiensis* with 88%. *Bacillus amyloliquefaciens* with 88% and *Bacillus subtilis* with 82% of eggs not hatched and in the J2 juvenile movement test the strain of *Bacillus subtilis* was the only one that suppressed the movement, with 60% of affected juveniles.

Keywords: *Meloidogyne*, *Bacillus*, emergencia, inhibir, eclosión, juveniles.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo general	2
Objetivos específicos.....	3
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	4
2.1.1. <i>Meloidogyne sp.</i>	4
2.1.1.1. Ubicación taxonómica	6
2.1.1.2. Características morfológicas	7
2.1.1.3. Ciclo de vida.....	7
2.1.1.4. Formas de reproducción.....	13
2.1.1.5. Síntomas y daños.....	14
2.1.2. <i>Bacillus spp.</i>	17
2.2. ANTECEDENTES.....	22
2.3. HIPÓTESIS	23
2.4. VARIABLES.....	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN.....	25
3.2. Lugar de ejecución	25

3.3. Población, muestra y unidad de análisis.....	26
3.4. Tratamientos en estudio	27
3.5. PRUEBA DE HIPÓTESIS	27
3.5.1. Diseño de la investigación	27
3.5.2. Datos a registrar	31
3.5.2.1. Prueba de emergencia de juveniles J2 en masa de huevos. 31	
3.5.2.2. Prueba de eclosión de huevos libres.....	31
3.5.2.3. Prueba de movimiento de juveniles J2 de <i>Meloidogyne</i> spp.31	
3.5.3. Técnicas e instrumentos de recolección de información	31
3.6. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	33
3.7. CONDUCCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	35
3.7.1. Preparación del inóculo de <i>Bacillus</i> spp.	35
3.7.2. Recuento en Unidades formadoras de colonia (UFC)	35
3.7.4. Prueba de emergencia de juveniles J2 de las masas de huevos..37	
3.7.5. Prueba de eclosión de huevos libres	38
3.7.6. Prueba de movimiento de juveniles 2	40
IV. RESULTADOS.....	42
V. DISCUSIÓN	54
VI. CONCLUSIONES	57

VII. RECOMENDACIONES 59

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	24
CUADRO 2. TRATAMIENTOS	27
CUADRO 3. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL DISEÑO DCA	29
CUADRO 4. ANÁLISIS DE VARIANZA - EMERGENCIA J2 DE LA MASA DE HUEVOS.....	42
CUADRO 5. TEST DE DUNNET - EMERGENCIA J2 DE MASAS DE HUEVOS.....	43
CUADRO 6. TEST DE DUNCAN - EMERGENCIA J2 DE MASAS DE HUEVOS.....	44
CUADRO 7. ANÁLISIS DE VARIANZA - ECLOSIÓN DE HUEVOS LIBRES	46
CUADRO 8. TEST DE DUNNET - ECLOSIÓN DE HUEVOS LIBRE	47
CUADRO 9. TEST DE DUNCAN - ECLOSIÓN DE HUEVOS LIBRES.....	47
CUADRO 10. ANÁLISIS DE VARIANZA - MOVIMIENTO J2.....	50
CUADRO 11. TEST DE DUNNET - MOVIMIENTO J2.....	51
CUADRO 12. TEST DE DUNCAN - MOVIMIENTO J2.....	51
CUADRO 13. CUADRO DE DATOS DE LA EMERGENCIA DE JUVENILES DE LAS MASAS DE HUEVOS.	67
CUADRO 14. DATOS DE LA ECLOSIÓN DE HUEVOS LIBRES.....	68
CUADRO 15. DATOS DEL MOVIMIENTO DE JUVENILES J2	69

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ASPECTO MORFOLÓGICO DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.	5
FIGURA 2. CICLO DE VIDA DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.	8
FIGURA 3. NEMATODO DE LA AGALLA DE LA RAÍZ	10
FIGURA 4. RAÍZ DE TOMATE ATACADA POR <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.	16
FIGURA 5. CROQUIS DEL ÁREA EXPERIMENTAL	30
FIGURA 6. UNIDAD EXPERIMENTAL	30
FIGURA 7. PREPARACIÓN Y RECUENTO DE DILUCIONES SERIADAS	36
FIGURA 8. RECUENTO EN CÁMARA NEUBAUER	37
FIGURA 9. PROCEDIMIENTO USADO EN LA PRUEBA DE EMERGENCIA DE JUVENILES EN LA OOTECA	38
FIGURA 10. PROCEDIMIENTO USADO EN LA PRUEBA DE ECLOSIÓN DE HUEVOS LIBRES	39
FIGURA 11. PROCEDIMIENTO USADO EN LA PRUEBA DE MOVIMIENTO DE JUVENILES J2.....	40
FIGURA 12. MEDIAS ESTIMADAS DE EMERGENCIA DE J2 DE LAS MASAS DE HUEVOS	44
FIGURA 13. PORCENTAJE DE J2 EMERGIDOS DE LAS MASAS DE HUEVOS.....	45
FIGURA 14. MEDIAS ESTIMADAS DE ECLOSIÓN DE HUEVOS LIBRES	48
FIGURA 15. PORCENTAJE DE J2 ECLOSIONADOS DE HUEVOS LIBRES	49

FIGURA 16. MEDIAS ESTIMADAS DE MOVIMIENTO DE JUVENILES J2	52
FIGURA 17. PORCENTAJE DE J2 MÓVILES DE MELOIDOGYNE SPP. ...	53
FIGURA 18. INSTALACIÓN DEL ENSAYO IN VITRO	70
FIGURA 19. CEPAS DE BACILLUS SPP.	70
FIGURA 20. MULTIPLICACIÓN DEL INÓCULO DE BACILLUS SPP.	71
FIGURA 21. DILUCIONES SUCESIVAS	71
FIGURA 22. RECUENTO DE LAS DILUCIONES EN PLACA.	72
FIGURA 23. MATERIALES PARA EL ENSAYO IN VITRO	72
FIGURA 24. RAÍZ DE VID CON NÓDULOS.....	73
FIGURA 25. NÓDULOS CON MASAS DE HUEVOS.	73
FIGURA 26. JUVENILES EMERGIDOS DE LA MASA DE HUEVOS.....	74



ÍNDICE DE ANEXOS

NO IMPRIMIR

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes retos que afronta la agricultura sostenible en la actualidad es mejorar la productividad reduciendo el riesgo de residuos tóxicos en los alimentos sobre todo de los que se consumen en fresco al mismo tiempo aumentar la seguridad del agricultor y preservar el medio ambiente.

Frente a esta situación una de las alternativas para la reducción del uso plaguicidas químicos es la introducción de sistemas de agentes biológicos; es decir la utilización de microorganismos para combatir las plagas que afectan a los cultivos.

Durante varios años los problemas de nematodos fitoparásitos han ido aumentando día tras día, causado graves daños a las raíces, reduciendo la superficie radicular de absorción, provocando pérdidas productivas y acortando la vida útil de las plantas.

Se ha implementado diferentes estrategias para contrarrestar el ataque de los nemátodos, entre las opciones aplicadas, son la fumigación de los suelos, pero requiere de la experiencia del trabajo para permitir un movimiento adecuado de los gases; la solarización, solo se puede realizar cuando no haya plantas y se logre alcanzar las temperaturas adecuadas y la aplicación de nematicidas que requieren de un previo análisis de nematodos

mediante realización de calicatas que permitirán la detección de síntomas y estimar la necesidad de hacer aplicaciones.

Estas complicaciones ocasionaron una tendencia generalizada del uso indiscriminado de nematicidas químicos para lograr disminuir los daños ocasionados por los nematodos y que solo se limitó por el aumento de los costos de producción y el rápido resurgimiento de las poblaciones.

Esto ha motivado la búsqueda de alternativas biológicas como parte de un manejo integrado. El uso de bacterias como agentes biocontroladores han demostrado su eficacia especialmente el género *Bacillus*, y ya hay estudios que demuestran su capacidad biocontroladora en nematodos, logrado buenos resultados gracias a las toxinas que son liberadas, las cuales logran afectar la morfología de huevos y juveniles.

Debido a que la utilización del género *Bacillus* en nematodos fitoparásitos es reciente y no hay muchos estudios del potencial como controlador de las diferentes especies de este género este proyecto puede ayudar a fomentar y conocer cómo actúan e influyen en *Meloidogyne* en condiciones *in vitro*. Por ser necesarios conocer los aspectos para una implementación de una estrategia de control de la plaga; por eso el presente trabajo tuvo los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Determinar los efectos de la aplicación de cepas de *Bacillus spp.* en el control *Meloidogyne spp.* en condiciones *in vitro*.

Objetivos específicos

- Determinar los efectos de la aplicación de las cepas de *Bacillus* spp. en la emergencia de juveniles de la masas de huevos de *Meloidogyne* spp. en condiciones *in vitro*.
- Determinar los efectos de aplicación de cepas de *Bacillus* spp. en la eclosión de huevos libres de *Meloidogyne* spp. en condiciones *in vitro*.
- Determinar los efectos de la aplicación de cepas de *Bacillus* spp. en el movimiento de juveniles de *Meloidogyne* spp. en condiciones *in vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1.1. *Meloidogyne spp.*

Los nematodos pertenecen al reino animal y aunque parecen gusanos son distintos taxonómicamente de los verdaderos. La mayoría de las miles de especies de nematodos conocidas viven libremente en el agua o en el suelo y se alimentan de microorganismos, plantas o animales pero algunos atacan y parasitan organismos vivos. Varios cientos de estas especies se alimentan de plantas vivas obteniendo su alimento con lanzas o estiletes. Esto produce enfermedades a lo ancho de todo el mundo, llegando a causar pérdidas del 14% de las cosechas. Los nematodos que parasitan las plantas son pequeños, de 300 a 1000 micrómetros aunque algunos pueden tener hasta 4 mm de largo por 15-35 micrómetros de ancho y este diámetro los hace visibles a simple vista pero pueden verse fácilmente bajo un microscopio. Su reproducción es por huevos (Requena, 2013:9).

Dropkin; citado por Subercaseaux (2011: 7), indica que los nemátodos del género *Meloidogyne* son endoparásitos sedentarios, causan agallas visibles en las raíces y disminución del desarrollo, sus plantas hospederas, incluyen en su mayoría hortalizas, cereales y algunos árboles. Las agallas inducidas por *Meloidogyne* son extremadamente variables en su tamaño, lo

cual dependerá de la relación hospedero-parásito. Ya que, las agallas se pueden ver sin necesidad de un microscopio, son la enfermedad más ampliamente conocida en la planta.

Según Agrios (2005), los nemátodos del nudo de la raíz, dañan a las plantas al debilitar las puntas de la raíz y al inhibir su desarrollo o estimular una formación radical excesiva, pero principalmente al inducir la formación de hinchamientos en las raíces, las cuales no sólo privan a las plantas de sus nutrientes sino también deforman y disminuyen el valor de muchas raíces de los cultivos.



Fuente: Propia

Figura 1. Aspecto morfológico de *Meloidogyne* spp.

2.1.1.1. Ubicación taxonómica

Las especies de *Meloidogyne* conforman una pequeña parte del Phylum *Nemata* o *Nematodea* el cual incluye parásitos del hombre, animales, plantas y especies que viven en el suelo, agua fresca y el mar. Pertenecen a la clase *Secernentea*, Orden *Tylenchida*, Super familia *Tylenchoidea*, y Familia *Meloidogynidae*. (Sánchez; 2006: 11).

Subercaseaux (2011: 8) menciona que los nemátodos fitoparásitos pertenecen al Phylum *Nematoda* y que la mayoría de los géneros parásitos importantes pertenecen al orden *Tylenchida*.

Canto (2010) señala que el género *Meloidogyne* se ubica dentro de la siguiente clasificación taxonómica.

Phylum: *Nemata*

Clase: *Secernentea*, Von Linstow 1950, Dougherty 1958.

Orden: *Tylenchida*, Thorne 1949.

Suborden: *Tylenchina*, Chitwood 1950.

Superfamilia: *Tylenchoidea*, Örley 1880.

Familia: *Heteroderidae*, Schuumans, Sterkhoven 1941.

Subfamilia: *Meloidogynidae*, Skarbilovich 1959.

Género: *Meloidogyne*, Göldi 1892.

2.1.1.2. Características morfológicas

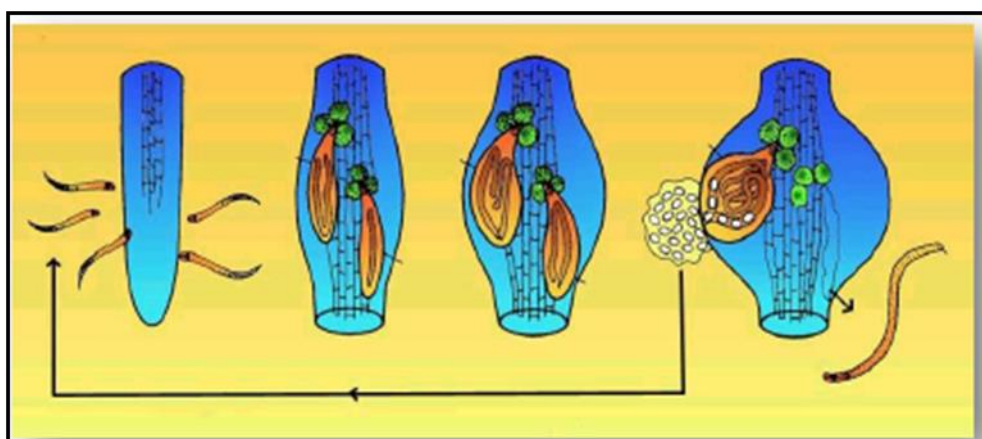
Taylor *et al*; citado por Farfán (2011: 3) señala que *Meloidogyne* es un nemátodo endoparásito sedentario únicamente durante los estados juveniles (J2, J3 y J4), mientras que la hembra lo es toda su vida con excepción del J1. Los adultos presentan un marcado dimorfismo sexual, pues si bien el macho presenta la forma alargada y cilíndrica con una longitud de 1,5 mm, la hembra se hincha considerablemente y presenta una forma engrosada, como una pera (piriforme) con una longitud de 0,8 mm. Presentan estilete y nódulos medianos visibles al microscopio, la abertura de la glándula esofagial dorsal en el procuerpo, con bulbo medio redondeado y no ocupa todo el diámetro del cuerpo. Procuerpo y bulbo medio distinguible el uno del otro (separados por una constricción más o menos pronunciada) y parte basal del esófago más grande que el bulbo medio.

El poro excretor es anterior y presenta la cutícula firmemente estriada con una anulación irregular en la región perineal. El patrón perineal es característico y permite diferenciar a las especies de *Meloidogyne*.

2.1.1.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de las especies de *Meloidogyne* spp. (Figura 2) comienza con un huevo, generalmente en estado unicelular, depositado por una hembra que está completa o parcialmente incrustada en una raíz del hospedero. Los huevos son depositados en una matriz gelatinosa que los

mantiene juntos en masas o sacos de huevos. El desarrollo del huevo comienza breves horas después de la ovoposición, resultando en 2, 4, 8 o más células, hasta que se ve una larva completamente formada, con un estilete, enrollada en la membrana del huevo. La primera muda tiene lugar en el huevo y no es difícil ver separada la cutícula del primer estadio, sobresaliendo más allá de la cabeza del segundo estadio larval. Poco después la larva emerge de un agujero hecho en un extremo del cascaron flexible del huevo, por medio de pinchazos repetidos con el estilete (Sasser y Taylor citado por Jaramillo, 2014).



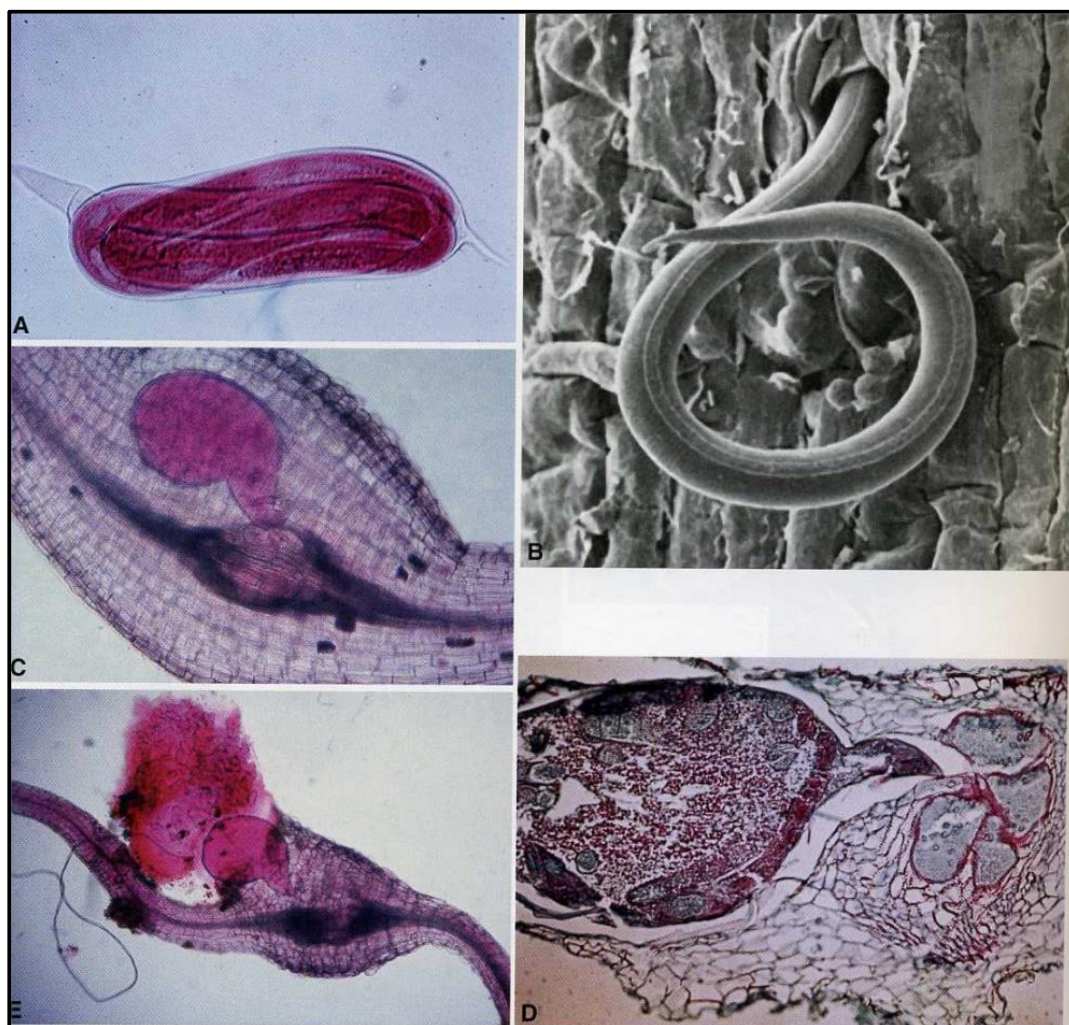
Fuente: Jaramillo (2014)

Figura 2. Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.

Sasser y Taylor citado por Jaramillo (2014), la larva del segundo estadio larval que ha emergido puede dejar o no dejar inmediatamente la masa de huevos. Generalmente hay varias larvas emergidas en la masa de huevos junto a huevos en varios estados de desarrollo. Después de dejar la masa de huevos, la larva se mueve a través del suelo en busca de una raíz

de la que pueda alimentarse. Parece que la búsqueda es al azar hasta que la larva se acerca a unos cuantos centímetros de una raíz. Luego guiado por algunas sustancias que emana de la raíz, se va trasladando directamente hacia la punta radicular. Las larvas del segundo estadio larval infectivo generalmente penetran en la raíz justamente sobre la caliptra. Se mueven principalmente entre las células no diferenciadas de la raíz y finalmente se colocan con sus cabezas en el cilindro central de desarrollo. Esto da lugar a la formación de células gigantes llamadas sincitos, formadas por un agrandamiento de las células conocido por hipertrofia. Al mismo tiempo, hay una intensa multiplicación de células vegetales denominado hiperplasia alrededor de la cabeza de la larva.

Como se observa en la figura 3. donde se muestra el ciclo del nematodo dentro de la raíz, en la figura (A) se observa el huevo de nematodo con un juvenil secundario (J2) listo para eclosionar. (B) Un J2, penetrando en una raíz. (C) Una hembra dentro de una raíz formando "células gigantes" para su alimentación. (D) Sección longitudinal de hembra de *Meloidogyne* alimentándose en células gigantes. (E) Hembra poniendo huevos en el exterior de la raíz. (Agris, 2005).



Fuente: Agrios (2005)

Figura 3. Nematodo de la agalla de la raíz

Talavera (2003: 5 - 6) menciona que generalmente pasan el invierno en suelo en forma de huevos. En primavera conforme la temperatura del suelo se incrementa, los juveniles de segundo estado J2s, eclosionan, emigran a través del suelo y penetran en las raíces de las plantas hospedadoras, donde establecen sitios de alimentación. Durante el crecimiento, los juveniles van engrosando y mudando hasta convertirse en hembras adultas o machos. Las

hembras son redondeadas e inmóviles, los machos filiformes y generalmente abandonan la raíz pues no se alimentan. Las hembras producen hasta 3000 huevos envueltos en una masa gelatinosa. Generalmente los nemátodos agalladores completan su ciclo en menos de un mes dependiendo de la temperatura del suelo y por tanto puede tener varias generaciones durante un cultivo.

Sánchez (2006: 11 - 13) sostiene que, la fase preparasítica del ciclo de vida comienza con un huevo que son depositados en una matriz gelatinosa que los mantiene juntos en masas o sacos. La primera muda tiene lugar en el huevo y poco después, el juvenil de segundo estado (J2) emerge y se mueve a través del suelo en busca de una raíz de la cual alimentarse. Luego, guiado por exudados que emanan desde la raíz, se va desplazando directamente hacia la punta de esta.

En la fase parasítica, los J2 infestivos generalmente penetran la raíz justamente sobre la caliptra, moviéndose principalmente entre las células no diferenciadas y colocando con sus cabezas en el cilindro central en desarrollo, con sus estiletes perforan las paredes de las células e inyectan secreciones de sus glándulas esofágicas. Estas secreciones causan un agrandamiento de las células (hipertrofia) en el cilindro vascular y aumentan la proporción de la división celular en el periciclo dando lugar a la formación de células gigantes multiplicación de células vegetales (hiperplasia) alrededor de la cabeza del

juvenil. Después del establecimiento de una relación hospedero parásito y un periodo inicial de alimentación de 3 a 8 semanas, el segundo estado juvenil rápidamente muda tres veces, y se desarrolla en una hembra sedentaria o macho adulto móvil. La hembra continúa su desarrollo en el tejido vegetal, aumentando su diámetro corporal. Si la planta es un hospedero adecuado y si el clima es templado, las hembras comienzan a depositar huevos después de 20 a 30 días de haber penetrado como larvas. La hembra secreta una sustancia gelatinosa y deposita los huevos sobre la misma, para unirlos y protegerlos. Al incubar los huevos, los juveniles escapan hacia el suelo, en busca de nuevas raíces, o permanecen y se desarrollan en la misma raíz. (Magunacelaya y Dagnino citado por Sánchez; 2006 11-12)

Hidalgo (2008; 5-6) Las especies del género *Meloidogyne*, sobreviven en el suelo como huevo y juvenil II. Los huevos son depositados por las hembras maduras en una especie de saco de huevos, el que corresponde a una matriz gelatinosa adherida a la parte posterior del cuerpo y que protege a los huevos de la deshidratación. El ciclo de vida de *Meloidogyne spp.* involucra cinco estados de desarrollo, que comienza con el desarrollo embriogénico dentro del huevo de lo cual resulta la formación del primer estado juvenil; éste posteriormente muda y da origen al segundo estado juvenil (II) dentro del huevo. El juvenil II eclosiona del huevo y migra en el suelo buscando su alimento, siendo éste el único estado infectivo. El juvenil II puede sobrevivir en el suelo bajo condiciones adversas en un estado de

quiescencia por un cierto período de tiempo, después se mueven a través del suelo en busca de una raíz de la cual alimentarse y guiados por exudados que emanan las plantas desde la raíz, se va desplazando directamente hacia la punta de ésta.

2.1.1.4. Formas de reproducción

Chitwood y Perry citado por Saire (2017: 8) indican que existen tres tipos de reproducción dentro del género *Meloidogyne*: (a) anfimixis, en el cual el esperma de los machos fertilizan los ovocitos en las hembras y posteriormente se produce una meiosis, (b) partenogénesis meiótica facultativa, en el cual en presencia de machos se produce una anfimixis, pero en su ausencia, se lleva a cabo una meiosis en los ovocitos, con dos de sus núcleos, con una reducción de complemento cromosómico (el pronúcleo y el segundo cuerpo polar), posteriormente se fusionan (automixis), y (c) partenogénesis mitótica obligada, donde los machos no están involucrados y uno de los dos núcleos producidos durante a división mitótica inicial dentro del ovocito se deteriora y el otro se convierte en el precursor del embrión posterior (apomixis). Solo siete de las 37 especies de *Meloidogyne* descritas por Taylor y Sasser (1983) fueron anfimícticas. Estas especies se consideran de menor importancia debido a su restringida distribución, baja gama de hospedantes y menor impacto económico. Al igual que muchos nematodos del suelo, la mayoría de especies de *Meloidogyne spp.* Son partenogénicas. El modo de

reproducción apomíctico se encuentra en las especies más importantes en cuanto a su distribución geográfica e impacto agronómico. Las poblaciones de una misma especie de *Meloidogyne* pueden ser diferentes en el modo de reproducción, por ejemplo, 29 de las 32 poblaciones estudiadas de *M. hapla* se reprodujeron por partenogénesis meiótica facultativa, las otras por partenogénesis mitótica. Una forma un poco diferente de la partenogénesis meiótica ha sido reportada en *M. floridensis*, donde se produce una supresión de la segunda división en la maduración, lo que indica que esta especie tiene un tipo de partenogénesis intermedia entre la partenogénesis meiótica con dos divisiones y la mitótica.

2.1.1.5. Síntomas y daños

Talavera (2003: 5-6) sostiene que las plantas infectadas por *Meloidogyne spp.* muestran amarillamiento, marchitamientos y reducciones en la producción. La infección de las raíces produce engrosamientos característicos o agallas que pueden ser de varios tamaños dependiendo del número de hembras que alberguen. Uno de los efectos de la infección de *Meloidogyne* es una deformación y reducción del sistema radicular, las raíces de las plantas atacadas presentan los típicos nódulos, están poco o nada ramificadas y carentes de pelos radiculares lo que ocasiona que decrezca la eficiencia en la normal translocación de agua y nutrientes y como consecuencia ocurren las típicas marchiteces de las plantas infectadas.

Requena (2013: 9-10) menciona que los nematodos de la agalla de la raíz dañan a las plantas porque desvitalizan las puntas de las raíces causando la formación de hinchamientos a lo largo de las raíces. Esos efectos no solo privan a la planta de nutrientes sino que también desfiguran y reducen el valor de mercado de innumerables productos hortícolas. Cuando la infección de las plantas susceptibles tiene lugar en el estado de plántula, las pérdidas son especialmente importantes, llegando incluso a causar la completa destrucción de la cosecha. La infección de las plantas maduras tiene efectos más suaves aunque también puede llegar a reducir la producción considerablemente. Los síntomas de la planta son una reducción del crecimiento y del número de hojas, siendo estas más pequeñas y de color verde pálido o amarillas, y marchitamiento de la planta siendo este más pronunciado en tiempo cálido. De todas formas, los síntomas más típicos de la enfermedad son los que aparecen en el sistema radicular de las plantas, cuando se desarrollan, las típicas agallas en las raíces, las cuales pueden multiplicarse varias veces el diámetro de una raíz sana.

Los nematodos del genero *Meloidogyne* spp. son ampliamente conocidos por la habilidad de producir cambios en el sistema radicular de las plantas, induciendo la pérdida de absorción de nutrientes. La absorción de nutrientes se limita por la alteración fisiológica de la raíz, el metabolismo para generar fuente de alimento se interrumpe y como efecto de esto la planta

reduce su crecimiento (enanismo) y su producción baja ocasionando grandes pérdidas en cultivos (Agrios, 2005)

Las agallas, producidas por una hipertrofia e hiperplasia celular en respuesta al ataque de las especies de *Meloidogyne*, traen como consecuencia plantas achaparradas o poco desarrolladas, esto debido a que disminuye la capacidad de las raíces para captar y transportar nutrientes al resto de la planta, lo que se traduce en un debilitamiento general y en pérdidas de producción esto a la vez que las plantas infectadas aumentan su susceptibilidad al estrés hídrico y son más fácilmente infectadas por otros microorganismos patógenos, que raíces sanas (Hidalgo; 2008: 7-8).



Fuente: Picho (2006)

Figura 4. Raíz de tomate atacada por *Meloidogyne* spp.

2.1.2. *Bacillus spp.*

El género *Bacillus spp.* Es uno de los géneros más comunes de bacterias de vida libre presentes en el suelo, se encuentran ubicadas desde las capas más superficiales hasta las más profundas, tienen una amplia distribución en todas las regiones geográficas del planeta, alcanzando alrededor del 24% del total de bacterias aisladas del suelo. Entre las ventajas que proporciona a las plantas su presencia destacan el control biológico de microorganismos fitopatógenos, la participación en la nutrición mineral y la fijación de nitrógeno. Numerosos géneros de esta especie son productores de sustancias con actividad funguicida y bactericida, entre las que figuran la subtilísima y la iturina. Su presencia predominante en el suelo, le ha permitido desarrollar capacidades para la mineralización de componentes nutricionales entre los que predominan el nitrógeno, fósforo, hierro y potasio. (Orberá *et al*; 2005)

Ministerio de Agricultura de Chile (2010) indica que el género *Bacillus* presenta distintas formas de control: libera toxinas al ambiente que afectan la morfología de los huevos y de los juveniles (J2) de los nematodos y, según la especie, puede colonizar ambos estados; también forma esporas que producen proteínas tóxicas para nematodos y distintos tipos de insectos, como, por ejemplo, endotoxinas que corresponden a inclusiones cristalinas de naturaleza proteica con una subunidad tóxica.

Calvo *et al* (2010) indica que el género *Bacillus* tiene la ventaja de poseer diferentes mecanismos para asegurar su sobrevivencia en el suelo ante condiciones físicas desfavorables; pueden producir endosporas altamente resistentes, se adaptan a cambios bruscos de temperatura y una capacidad metabólica muy diversa que le permite tener una colonización exitosa en la rizosfera. Posee mecanismos promotores de crecimiento entre ellos se encuentra la solubilización del fosfato, síntesis de fitohormonas como el ácido indol acético y la capacidad de controlar algunos hongos patógenos de la rizosfera.

Las especies de *Bacillus* han sido reportadas como promotoras de crecimiento en un número amplio de plantas y además un género muy efectivo en el control biológico de nematodos como *Meloidogyne*, *Heterodera* y *Rotylenchulus* (Kokalis-Burelle *et al*; Siddiqui y Mahmood; citados por Isla, 2016).

Nagesh *et al* citado por Isla (2016), confirmaron la importancia del género *Bacillus* y sus resultados demostraron que *B. cereus* reduce el 90 % la eclosión de los huevos de nematodos, causando la mortalidad de juveniles en 100 %.

2.1.2.1. *Bacillus thuringiensis*

La bacteria *Bacillus thuringiensis* es un bacilo gram positivo, con un tamaño promedio de 2 a 5 μm por 1 a 1.2 μm , flagelos peritrícos y esporulado que se caracteriza por la formación de un cuerpo paraesporal o cristal de proteína (proteínas Cry y Cyt), conocida como delta-endotoxina (δ -endotoxinas,) estos cristales se forman durante la esporulación y tienen actividad toxica para larvas de insectos. A la fecha se conoce a seis proteínas Cry (Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14 y Cry21) se les conoce su actividad toxica para larvas de nematodos de vida libre o parásitos (Jaramillo; 2014).

Márquez *et al* (2006) señala que la bioactividad que ejerce *Bacillus thuringiensis* sobre varios grupos taxonómicos de insectos plagas se debe a la variabilidad tóxica de los cristales parasporales que produce. Pero la mayoría de estudios que demuestran la actividad nematocida han sido realizados en nematodos de vida libre o zoonematodos.

Durante la última década se han realizado intensos estudios de los efectos nematocidas de *Bacillus thuringiensis* principalmente dirigidos al desarrollo de preparaciones bacterianas efectivas contra nematodos fitoparásitos (Mohammed *et al* citado por Jaramillo, 2014)

2.1.2.2. *Bacillus subtilis*

Torres (2013: 32-33) señala que es uno de los más eficaces agentes de biocontrol, el cual exhibe actividad antagonista contra varios hongos y

bacterias patogénicas, esta acción biocontroladora esta medida por la producción de metabolitos antibióticos capaces de actuar sobre microorganismos de diversas etiologías (antibiosis). Los péptidos que producen y que tienen esta acción son varios y representan un grupo no muy heterogéneo entre sí de metabolitos activos que afectan directamente a algunos fitopatógenos.

Microorganismo cuyo hábitat natural es el suelo, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Entre sus principales características se encuentra su capacidad para formar esporas en diversas condiciones de estrés, crecer en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta los 55°C), presentar motilidad, aerotaxis y velocidades de crecimiento altas, sobrevivir en concentraciones salinas (hasta el 7 % de NaCl), producir una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares. Por otra parte, el extracto no celular de *B. subtilis*, se reporta que también tiene un alto grado de propiedades larvicidas sobre nudos y quistes de nematodos. Las endotoxinas producidas por *B. subtilis*, intervienen con el ciclo reproductivo de nematodos, en el estadio de ovulación y eclosión de juveniles, considerando a *B. subtilis* como supresor del nematodo formador de agallas en el cultivo de tomate (Soto *et al*; 2012).

2.1.2.3. *Bacillus licheniformis*

El género *Bacillus spp.* se caracteriza por su capacidad para la producción de proteasas, donde el sobrenadante del cultivo de la bacteria

ayuda a degradar la cutícula de los nematodos; en especial la cepa de *Bacillus licheniformis* reduce el porcentaje en la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*, donde existe un efecto combinado de naturaleza enzimática sobre la pared de los huevos y que inhibe el proceso de eclosión (Pascual, M; 2013: 26 – 28).

Márquez *et al* (2003) demostró que *Bacillus licheniformis* resultó ser mejor para control de *Meloidogyne incognita* en condiciones *in vitro* y su acción nematicida se relacionó con la presencia de enzimas exocelulares.

2.1.2.4. *Bacillus amyloliquefaciens*

Es una bacteria gram positiva, relacionada estrechamente con *Bacillus subtilis*. La estructura, el metabolismo y ciclo de vida de *B. amyloliquefaciens* es en forma de varillas gram positivas con flagelos peritricos permitiendo la motilidad y al igual que otras especies de *Bacillus*, también forma esporas que le permiten la supervivencia durante un largo periodo de tiempo. Esta especie también muestra algunas propiedades antifúngicas que son influenciados por la disponibilidad de nitrógeno del medio ambiente (López; 2017: 13 – 14)

Moncada (2014: 18 – 19), menciona que en investigaciones anteriores se evaluó el uso de *B. amyloliquefaciens* en suelo y plántulas de tomate infectados con *Ralstonia solanacearum* obteniendo disminución de la

incidencia de la enfermedad y un efecto de promoción de crecimiento en las plantas.

2.2. ANTECEDENTES

Márquez *et al*; 2003: evaluó la actividad nematocida de diferentes aislados de *Bacillus spp.* demostrando que los mejores resultados en reducción de la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* se obtuvieron con las cepas *Bacillus licheniformis* RI75-1 con un 82 % y BKM -1 con 80,10 %. En relación con los cultivos de las cepas de *Bacillus thuringiensis*, la cepa LBT-25 fue más eficiente con un 88 % de reducción de la eclosión.

Jaramillo; 2014: probó la actividad nematocida de 23 cepas de *Bacillus thuringiensis* contra J2 de *Meloidogyne incognita* demostrando que solo 14 (60,86 %) cepas lograron una mortalidad superior al 60 % y después de la prueba en invernadero la cepa GM-2 logró el 58 % de reducción en número de nódulos y 70 % de reducción en número de huevecillos, HI-1, HD-59 y GM-70 demostraron una reducción de huevecillos superior al 60 % (63, 67 y 65 %).

Palacios; 2013: demostró que no existe diferencia significativa en la eficiencia de 3 dosis (1, 2 y 3 l/ha) de *Bacillus subtilis* aplicados sobre J2 de *Meloidogyne incognita*. La dosis de 1 y 2 l/ha redujeron la misma cantidad de

nemátodos (64,09 % y 63,81 %) y la tercera dosis de 3 l/ha redujo la mayor cantidad de nemátodos (74,39 %).

Soto *et al*; 2012: Evaluó el efecto de *Bacillus subtilis* como agente supresor de *Meloidogyne spp.* en el cultivo de *Capsicum*. Los resultados de la investigación muestran que el efecto que ejerce la bacteria *Bacillus subtilis* sobre la población de *Meloidogyne spp.* está relacionada con la cantidad de esporas inyectadas y materia orgánica, que se hace evidente en el ensayo I al aplicar esporas/ml de *Bacillus subtilis* sobre suelo con materia orgánica de 30 tn/ha, siendo efectividad aproximada de 99 %, comportamiento similar se registra sobre el ensayo II con tratamiento 1×10^6 y 2×10^6 esporas/ml.

2.3. HIPÓTESIS

Hipótesis general

1. La aplicación de las cepas de *Bacillus spp.* entonces se tendrán efectos significativos en el control de *Meloidogyne spp.* en condiciones *in vitro*.

Hipótesis específicas

1. La aplicación de cepas de *Bacillus spp.* tendrán efectos significativos en la emergencia de juveniles de la masa de huevos de *Meloidogyne spp.* en condiciones *in vitro*.

2. La aplicación de cepas de *Bacillus* spp. tendrán efectos significativos en la eclosión de huevos libres de *Meloidogyne* spp. en condiciones *in vitro*.
3. La aplicación de cepas de *Bacillus* spp. tendrán efectos significativos sobre el movimiento de *Meloidogyne* spp. en condiciones *in vitro*.

2.4. VARIABLES

Cuadro 1. Operacionalización de variables

Variable	Indicador
Independiente	
Cepas de <i>Bacillus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Dependientes	
Población de nematodos	<ul style="list-style-type: none"> - Prueba de emergencia de juveniles J2 de la masa de huevos - Prueba de eclosión de huevos libres. - Prueba de movimiento de juveniles J2.

Fuente: Elaboración propia.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

a) Tipo de investigación

Aplicada porque se aplicó los conocimientos científicos sobre cepas de *Bacillus* para generar tecnología expresada en el tratamiento adecuada de control dirigidos a solucionar problemas de nematodos.

b) Nivel de investigación

Experimental porque se manipuló la variable independiente (Cepas de *Bacillus spp.*) y se midió la variable dependiente (población de *Meloidogyne spp.*) comparándolo con los testigos (sin aplicación).

3.2. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se ejecutó en el laboratorio de la empresa de INNOVAK GLOBAL.

a) Ubicación Política

Región : Lima

Provincia : Lima

Distrito : Los Olivos
Dirección : Jr. El Níquel 282 Urb. Ind. Infantas.

b) Posición Geografía

Latitud sur : 14° 06'38''
Longitud oeste : 75° 17'23''
Altitud. : 833 msnm.

3.3. POBLACIÓN, MUESTRA Y UNIDAD DE ANÁLISIS

a) Población

La población estuvo formada por 20 unidades experimentales.

b) Muestra

Cada placa Petri utilizada en el ensayo *in vitro* constituyó un área neta experimental y dentro de ellas se colocaron 40 masas de huevo, un promedio de 2 000 huevos libres y 3 000 juveniles de *Meloidogyne spp.*

c) Tipo de muestreo

Es probabilística en su forma de Muestreo Aleatorio Simple (MAS) porque todos los nemátodos tuvieron la misma posibilidad de ser escogidos como integrantes de la muestra establecidas.

d) Unidad de análisis

Cada huevo y por cada juvenil de *Meloidogyne spp.*

3.4. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

Los tratamientos en estudio se indican en el cuadro siguiente:

Cuadro 2. Tratamientos

TRATAMIENTOS		
Clave	Agente de control	Concentración
T1	Testigo sin aplicación	Sin aplicación
T2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	10 ⁷ UFC
T3	<i>Bacillus subtilis</i>	10 ⁷ UFC
T4	<i>Bacillus licheniformis</i>	10 ⁷ UFC
T5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	10 ⁷ UFC

Fuente: Elaboración propia

3.5. PRUEBA DE HIPÓTESIS

3.5.1. Diseño de la investigación

Experimental en su forma de Diseño Completamente al Azar, con 5 tratamientos y 4 repeticiones, haciendo un total de 20 unidades experimentales.

a) Técnicas Estadísticas

Para la prueba de hipótesis se realizó la prueba de F, al nivel de significación de 0.05 para tratamientos.

Al existir diferencia significativa, se usó la prueba o test de Dunnet (Tratamiento-Testigo) con un nivel de significancia de 0.05. Para la formación de subgrupos de los tratamientos, se usó la prueba o test de Duncan con un nivel de significancia de 0.05.

Modelo de un Diseño DCA

$$Y = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

μ : Efecto medio global de la variable de respuesta.

τ_i : Es el efecto del i – ésimo tratamiento.

ε_{ij} : el término del error

Hipótesis a probar

Ho: Todos los tratamientos son iguales estadísticamente

$$T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = \dots = T_i$$

Ha: Al menos uno de los tratamientos es diferente estadísticamente.

$$T_1 \neq T_2 \neq T_3 \neq T_4 \dots \neq T_i$$

Análisis de varianza

Cuadro 3. Análisis de varianza para el diseño DCA

Fuente de varianza	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada
Tratamiento	t - 1 (A)	$\sum x^2 i / r - FC$ (C)	C / A (E)	E / F
Error	T(r - 1) (B)	SCT - SCt (D)	D / B (F)	
Total	Tr - 1	$\sum_{i = j} x^2 ij - FC$		

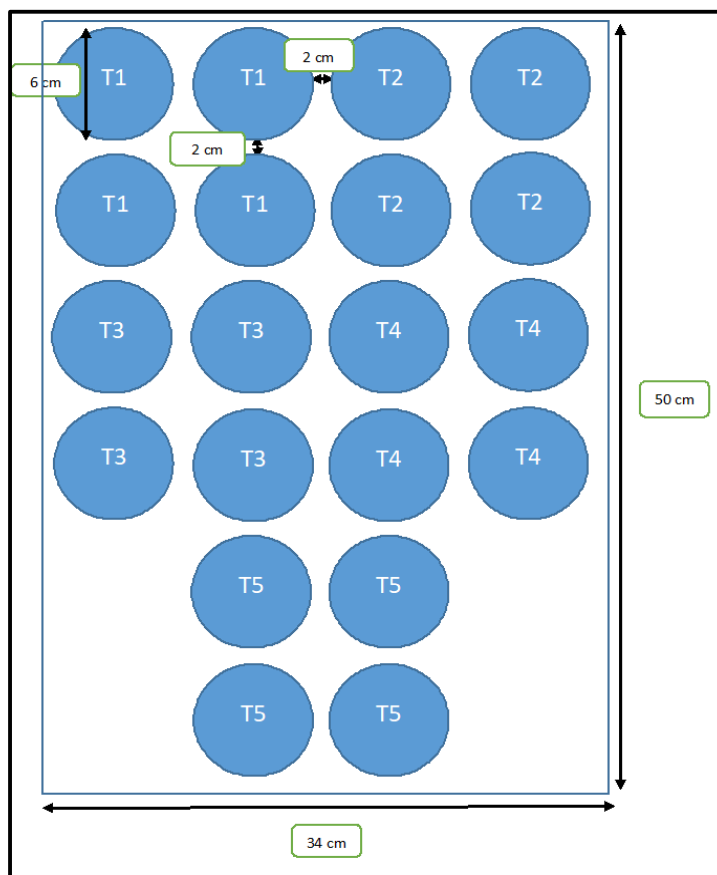
Fuente: Montgomery (1996)

Características de la distribución en laboratorio

- Largo: 50 cm.
- Ancho: 34 cm.
- Área total: 1 700 cm².

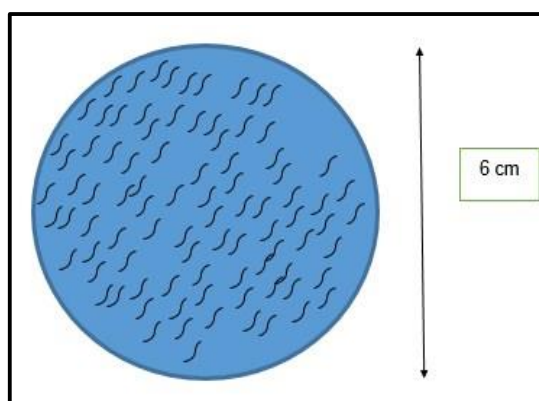
Característica de la unidad experimental

- Diámetro: 6 cm
- Radio: 3 cm
- Área total de la unidad: 28.27 cm².



Fuente: Elaboración propia

Figura 5. Croquis del área experimental



Fuente: Elaboración propia

Figura 6. Unidad experimental

3.5.2. Datos registrados

3.5.2.1. Prueba de emergencia de juveniles J2 en la masa de huevos.

Se determinó el número de los juveniles emergidos J2 de las masas huevos por tratamientos a los 9 días de exposición continua. Contabilizándose los juveniles que atraviesan el tamiz. Los resultados se expresan en porcentaje de juveniles J2 emergidos.

3.5.2.2. Prueba de eclosión de huevos libres

Se evaluó el número de juveniles emergidos a los nueve días de exposición continua a los tratamientos, contabilizándose los juveniles que atravesaron el papel facial. Los resultados se expresan en porcentaje de J2 eclosionados de huevos libres.

3.5.2.3. Prueba de movimiento de juveniles J2 de *Meloidogyne* spp.

Se determinó el número de individuos móviles que atravesó el papel facial durante los siguientes nueve días de exposición a los tratamientos. Los resultados se expresan en porcentaje de juveniles móviles.

3.5.3. Técnicas e instrumentos de recolección de información

A. Técnicas bibliográficas y de campo

a) **Fichaje**

Se obtuvo la información bibliográfica para elaborar el marco teórico y la literatura citada.

b) **Observación**

Permitió recolectar los datos directamente del campo experimental.

B. Instrumentos de recolección de información

a) Instrumentos bibliográficos

Fichas de localización

- Hemerográfica: se utilizó para recopilar información del internet, revistas del tema en estudio.
- Bibliográficas: se utilizó para recopilar información de los libros, tesis.

Fichas de investigación

- Textuales: se utilizó para la recopilación de información de manera textual.
- Resúmenes: se utilizó para la recopilación de información de manera resumida.

b) Instrumentos de campo

Libreta de campo: se utilizó para tomar datos de cada ensayo.

Guía de laboratorio: se utilizó para realizar los análisis nematológicos.

3.6. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

A. Materiales

- Placas Petri
- Papel facial
- Tubos de PVC
- Tul
- Pipetas graduadas descartables
- Micropipeta de 1 000 μ l
- Puntas azules de 100 a 1 000 μ l
- Puntas amarillas de 10 a 100 μ l
- Tubos con agua destilada
- Agua destilada estéril
- Beaker
- Matraces
- Probetas
- Regla

- Punzón
- Recipientes de plástico
- Bomba de pecera
- Cámara Neubauer
- Placas con medio TGE
- Hipoclorito de sodio al 0.5 %
- Bomba de succión
- Tubos con perlas estériles
- Stickers de precios
- Asa de siembra
- Bisturí

B. Reactivos

- Caldo nutritivo

C. Equipos

- Cabina de flujo laminar
- Cámara fotográfica
- Balanza gramera
- Contometro
- Estereoscopio

- Incubadora
- Autoclave
- Shaker
- Microscopio
- Refrigeradora
- Vortex

3.7. CONDUCCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

3.7.1. Preparación del inóculo de *Bacillus spp.*

Se reactivaron las cepas de los *Bacillus* seleccionados provenientes del cepario de la empresa Innovak Global. Para su multiplicación se realizó el lavado con agua destilada estéril del contenido de la placa de TGE conteniendo la cepa del *Bacillus spp.* y se realizó la inoculación al matraz con 500 ml de caldo nutritivo dentro de la cabina de flujo laminar. Se colocó en el shaker por 24 horas.

3.7.2. Recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

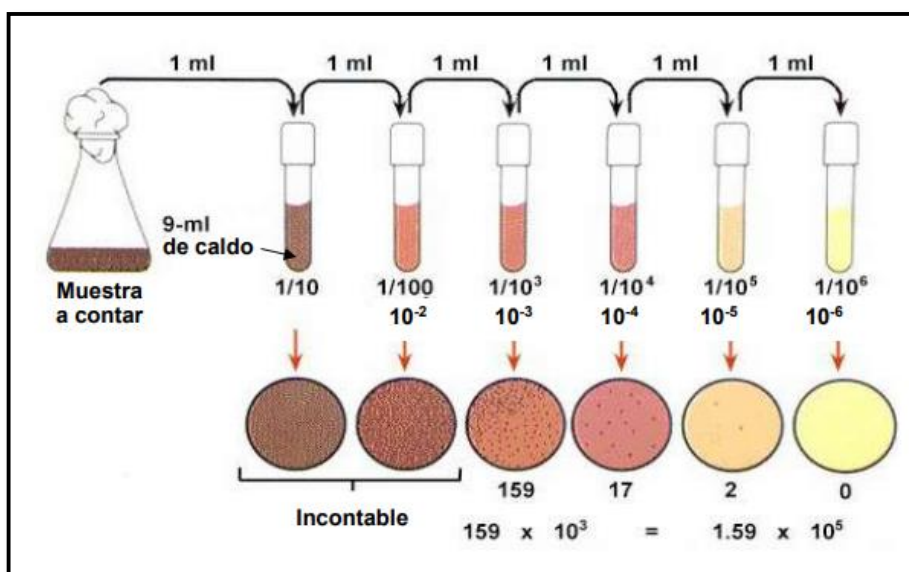
Se realizó siguiendo la metodología descrita por Soria *et al* (2001) que señala que primero hay que preparar tubos de 12 mm x 12 mm, que contengan 9 ml de agua destilada esterilizada y a la que se le añade 1 ml de la muestra madre y realizar diluciones sucesivas. Después se

realizó la siembra de las diluciones en placas Petri estériles. Se pusieron a incubar durante 2 días a una temperatura de 38°C.

Después del plazo se realiza el recuento por dilución y se determina la concentración por UFC.

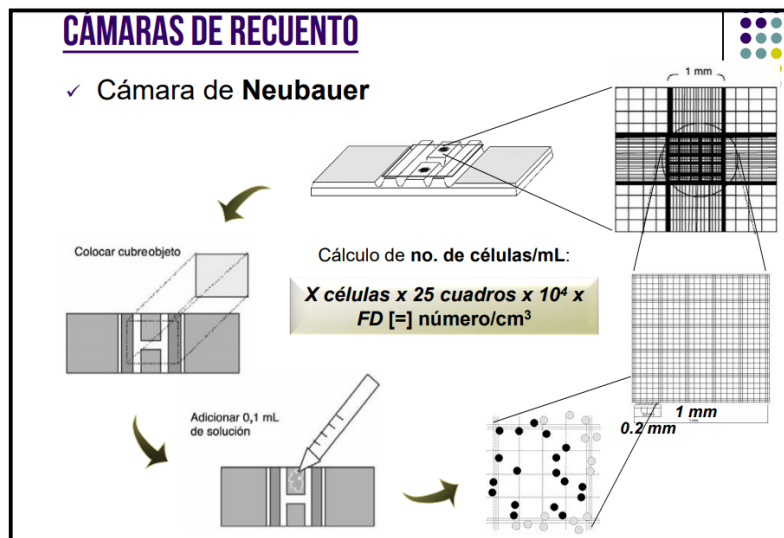
También se realizó el recuento por cámara Neubauer y luego se realizó el ajuste de la concentración de 10^7 .

Una vez obtenido todos los cultivos a la concentración deseada se refrigeró para su conservación y posterior aplicación.



Fuente: Rojas, C (s.f.)

Figura 7. Preparación y recuento de diluciones seriadas



Fuente: Rojas, C. (s.f.)

Figura 8. Recuento en cámara Neubauer

3.7.3. Obtención del inóculo de *Meloidogyne spp.*

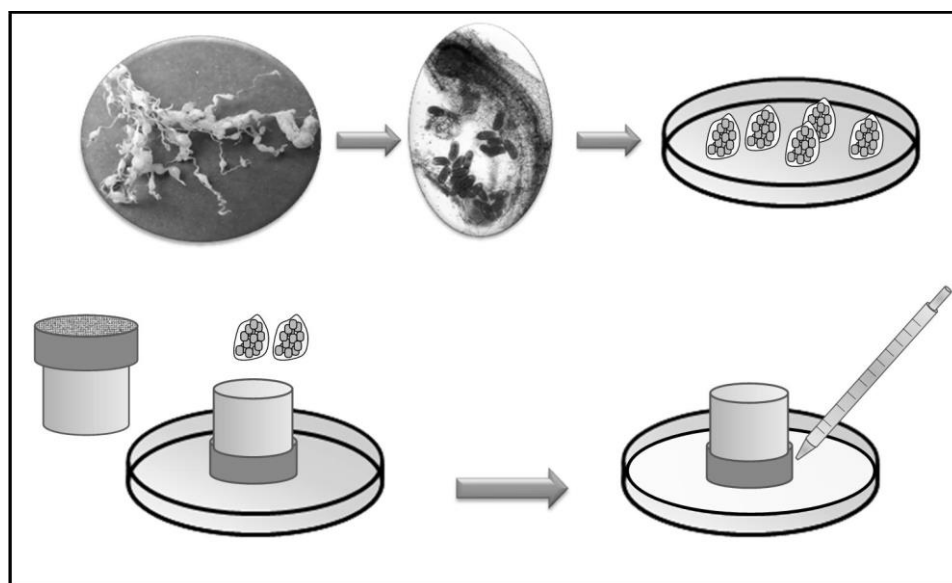
La población de *Meloidogyne spp.* fue extraída de raíces infectadas del cultivo de vid, proporcionadas por el fundo Odín del departamento de Piura.

Con ayuda del estereoscopio y un punzón fueron extraídas las masas de huevos directamente de las raíces, que fueron usadas para todas las pruebas y se las colocó en una placa Petri con agua de caño.

3.7.4. Prueba de emergencia de juveniles J2 de las masas de huevos

Se realizó el ensayo según la metodología descrita por Farfán (2011) donde se transfirieron dos ootecas (masas de huevo) dentro de los tamices de 2 cm de alto y 1 cm de ancho, diseñados con tubos de PVC

y tul en la base. Estos fueron colocados dentro de las placas con los distintos tratamientos y se evaluaron cada 3 días hasta que ya no emergió ningún juvenil, entonces se suspendió el tamiz con las ootecas en agua, evaluándose por última vez al tercer día.



Fuente: Farfán (2011)

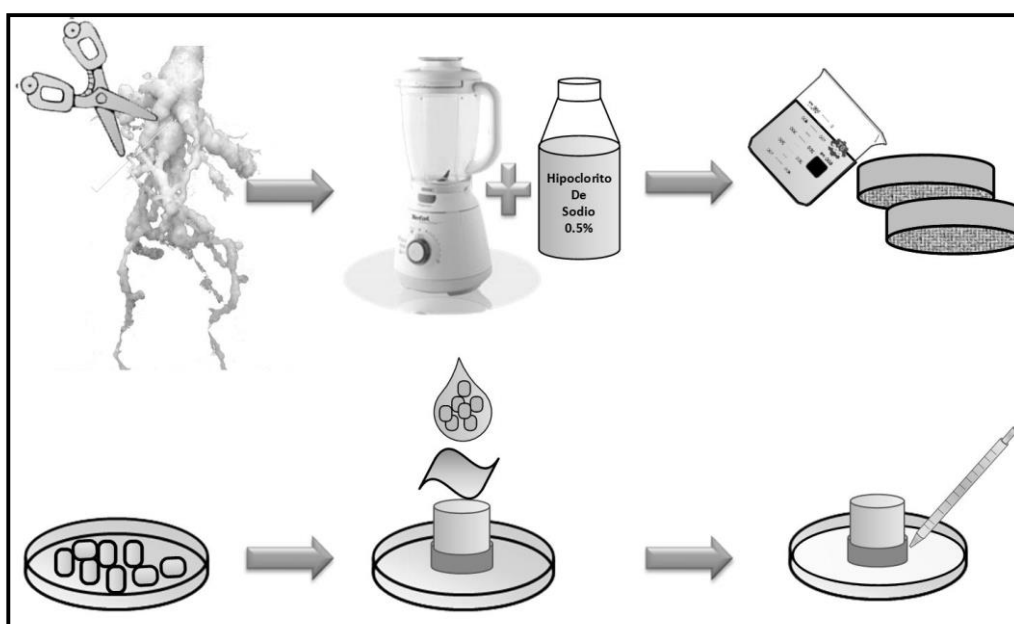
Figura 9. Procedimiento usado en la prueba de emergencia de juveniles en la ooteca

3.7.5. Prueba de eclosión de huevos libres

Se obtuvieron los huevos libres por medio del método de Hussey y Backer descrito por Farfán (2011) que consiste en pesar las raíces, picarlas y sumergirlas en un recipiente con 0.5 % de hipoclorito de sodio hasta cubrir las. El frasco se cierra herméticamente y se sacudió manualmente por un periodo de tres minutos.

Luego se transfirió el contenido a los dos tamices de No. 40 y 500 y se enjuagó con abundante agua de caño. En el primer tamiz quedaron los restos de raíces y partes vegetales de la plata. Los huevos quedaron retenidos en el tamiz No. 500. Se colectó los huevos en agua con ayuda de la piseta y se vertió a un vaso beaker.

Con la ayuda del estereoscopio se transfirió alrededor de 100 huevos sobre el papel facial humedecido dentro de los tamices de PVC pequeños colocados en cada tratamiento. Una vez que no emergió ningún juvenil se transfirió los huevos restantes en agua. Evaluándose por última vez al tercer día.

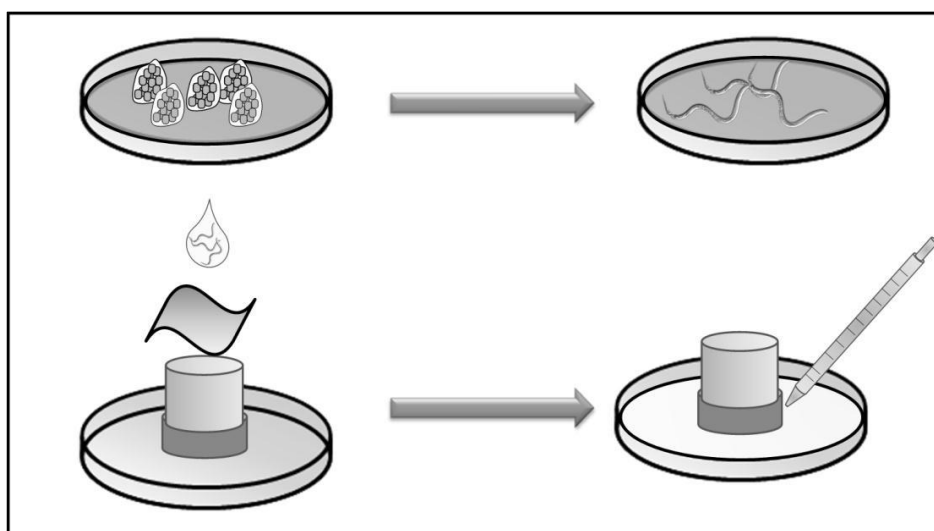


Fuente: Farfán (2011)

Figura 10. Procedimiento usado en la prueba de eclosión de huevos libres

3.7.6. Prueba de movimiento de juveniles 2

Para obtener los J2 se siguió la metodología descrita por Farfán (2011) y se colocaron las masas de huevo en placas Petri de 10 cm de diámetro conteniendo agua de caño y semillas de tomate, después de unos pocos días se colectaron los juveniles que fueron usados en la prueba de movimiento. Se preparó los pequeños tamices de PVC y en el interior se colocó papel fácil humedecido sobre el cual se puso alrededor de 150 juveniles aproximadamente; estos tamices fueron colocados dentro de cada tratamiento. Los individuos no afectados por los tratamientos atravesaron el papel facial según el principio del método de la bandejita (Canto, 2008). Una vez que ningún J2 traspasó el tamiz se cambió el tratamiento por agua y se evaluó por última vez después de tres días.



Fuente: Farfán (2011)

Figura 11. Procedimiento usado en la prueba de movimiento de Juveniles J2

3.7.7. Recolección de datos y evaluación

Se recolecto los resultados extraídos de cada prueba y para el análisis estadístico que se utilizó el programa estadístico SPSS.

IV. RESULTADOS

4.1. PRUEBA DE EMERGENCIA DE JUVENILES J2 DE LA MASA DE HUEVOS

En esta prueba *in vitro* los resultados se expresaron como el número de J2 eclosionados dentro de la masa mucilaginoso.

El tratamiento testigo (agua), presento el mayor número promedio de J2 eclosionados al no existir ningún control.

Los datos obtenidos se encuentran en el Anexo 1.

Cuadro 4. Análisis de varianza - Emergencia J2 de la masa de huevos

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	199373,000 ^a	4	49843,250	417,973	,000
Interceptación	195031,250	1	195031,250	1635,482	,000
Tratamiento	199373,000	4	49843,250	417,973	,000
Error	1788,750	15	119,250		
Total	396193,000	20			
Total corregido	201161,750	19			

CV= 11%

Promedio(\bar{x})= 98,75

Según el cuadro 4, se puede observar que la significancia de la variable tratamiento es menor a 0.05, por lo tanto, existe diferencia significativa, por lo que se procedió a realizar el test de Dunnett y posteriormente, el test de Duncan.

Cuadro 5. Test de Dunnett - Emergencia J2 de masas de huevos

	(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
				Límite superior
T de Dunnett (<control) ^a	B. thuringiensis	Testigo	,000	-233,31
	B. subtilis	Testigo	,000	-221,81
	B. licheniformis	Testigo	,000	-205,31
	B. amyloliquefaciens	Testigo	,000	-68,06

Los resultados de la prueba de Dunnett (Cuadro 5), se puede observar que todas las cepas de *Bacillus* spp. en comparación con el testigo ejercen efecto significativo en la emergencia de juveniles J2 de la masa de huevos.

Se procedió a realizar el Test de Duncan para la formación de subconjuntos.

Cuadro 6. Test de Duncan - Emergencia J2 de masas de huevos

Tratamientos	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
Duncan ^{a,b} B. thuringiensis	4	7,50			
B. subtilis	4	19,00			
B. licheniformis	4		35,50		
B. amyloliquefaciens	4			172,75	
Testigo	4				259,00
Sig.		,157	1,000	1,000	1,000

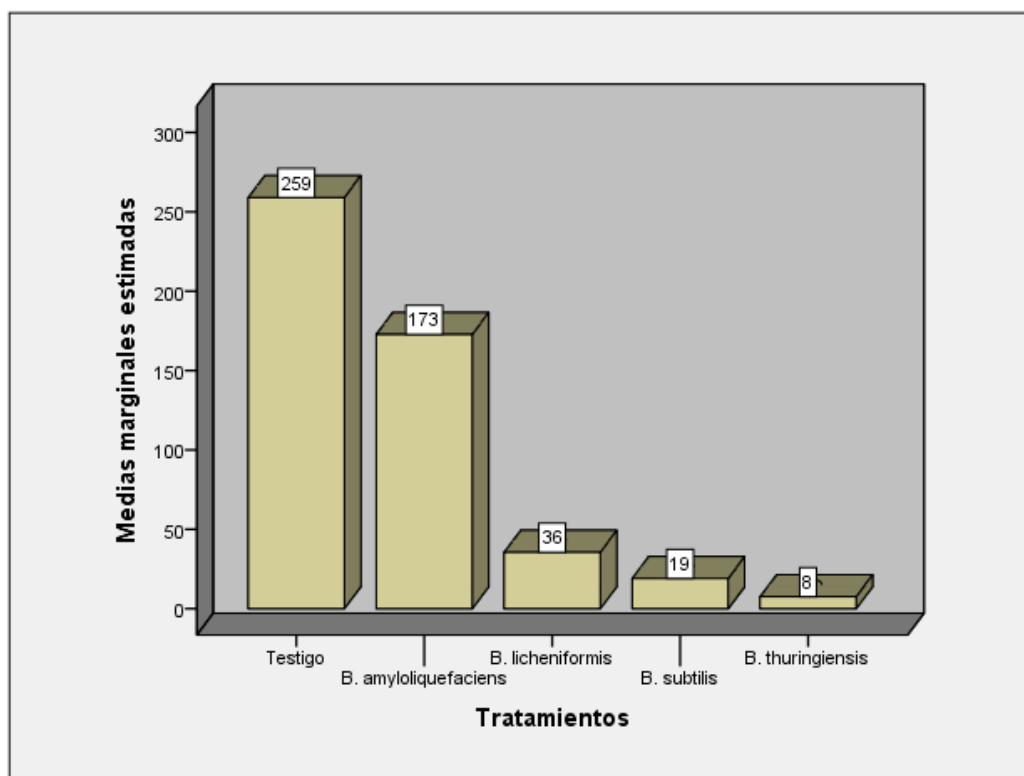


Figura 12. Medias estimadas de Emergencia de J2 de las masas de huevos

Los resultados del test de Duncan (Cuadro 6.) muestran la formación de 4 subconjuntos, desde el menor al mayor número de juveniles emergidos y donde:

- Subconjunto 1: formado por *B. thuringiensis* y *B. subtilis* con un media de 7,5 y 19,0 respectivamente, que forman ambas este subconjunto por ser estadísticamente similares.
- Subconjunto 2: *Bacillus licheniformis* con una media de 35,5.
- Subconjunto 3: *Bacillus amyloliquefaciens* con una media de 172,75.
- Subconjunto 4: Testigo

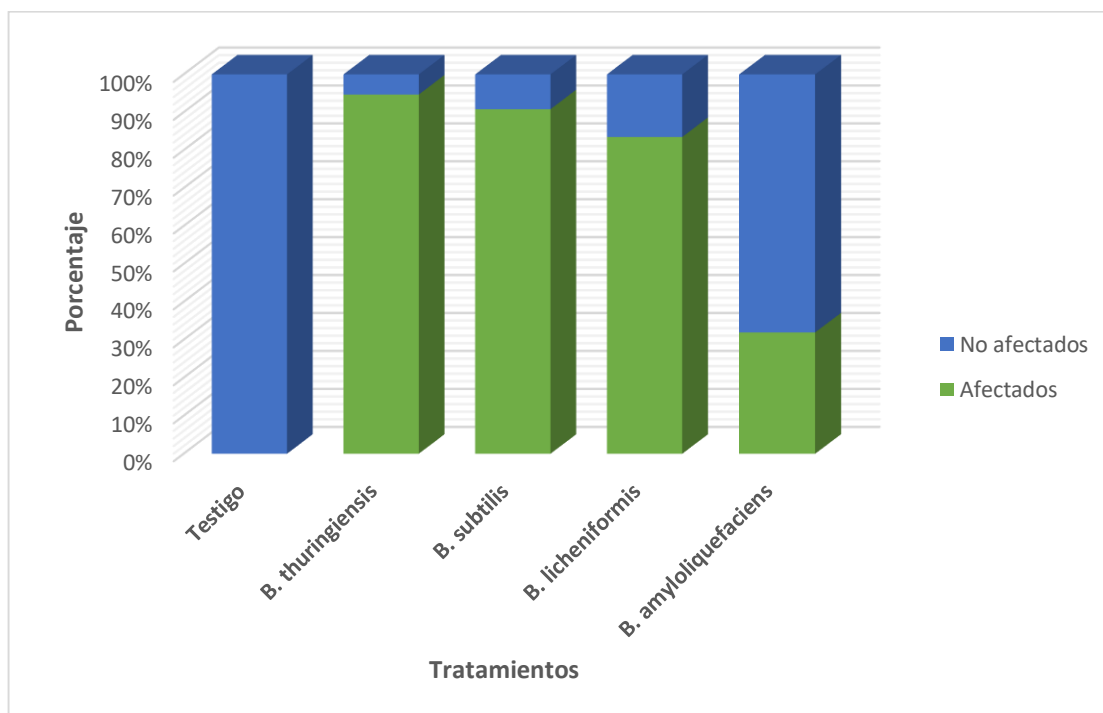


Figura 13. Porcentaje de J2 emergidos de las masas de huevos

En la figura 13, se muestra el porcentaje de juveniles J2 emergidos después de haber sido colocados en agua. Se observó que incluso después de que las masas de huevos fueron retiradas de los tratamientos, colocados en agua y se les mantuviera por tres días consecutivos se logró un control efectivo de *B. thuringiensis* con un porcentaje del 95%, seguido por *B. subtilis* con 91% y *B. licheniformis* con el 83% en masas de huevos. La cepa que logró un menor control fue *Bacillus amyloliquefaciens* con 32% de efectividad.

4.2. PRUEBA DE ECLOSIÓN DE HUEVOS LIBRES

En esta prueba *in vitro* los resultados se expresaron como el número de J2 eclosionados de los huevos libres.

El tratamiento testigo (agua), presentó el mayor número promedio de J2 eclosionados al no existir ningún control.

Los resultados obtenidos se encuentran en el Anexo 2

Cuadro 7. Análisis de varianza - Eclosión de huevos libres

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	58609,000 ^a	4	14652,250	481,190	,000
Interceptación	20801,250	1	20801,250	683,128	,000
Tratamiento	58609,000	4	14652,250	481,190	,000
Error	456,750	15	30,450		
Total	79867,000	20			
Total corregido	59065,750	19			

CV= 17% Promedio(\bar{X})= 32.35

Según el cuadro 7, se puede observar que la significancia de la variable tratamiento es menor a 0.05, por lo tanto, existe diferencia significativa, por lo que se procedió a realizar el test de Dunnett y posteriormente, el test de Duncan.

Cuadro 8. Test de Dunnett - Eclosión de huevos libre

	(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
				Límite superior
T de Dunnett (<control) ^a	B. thuringiensis	Testigo	,000	-125,81
	B. subtilis	Testigo	,000	-126,06
	B. licheniformis	Testigo	,000	-127,81
	B. amyloliquefaciens	Testigo	,000	-124,81

Los resultados de la prueba de Dunnett (Cuadro 8), se puede observar que todas las cepas de *Bacillus* spp. en comparación con el testigo ejercen efecto significativo en la eclosión de huevos libres.

Cuadro 9. Test de Duncan - Eclosión de huevos libres

Tratamientos	N	Subconjunto	
		1	2
Duncan ^{a,b}			
B. licheniformis	4	3,50	
B. subtilis	4	5,25	
B. thuringiensis	4	5,50	
B. amyloliquefaciens	4	6,50	
Testigo	4		140,50
Sig.		,490	1,000

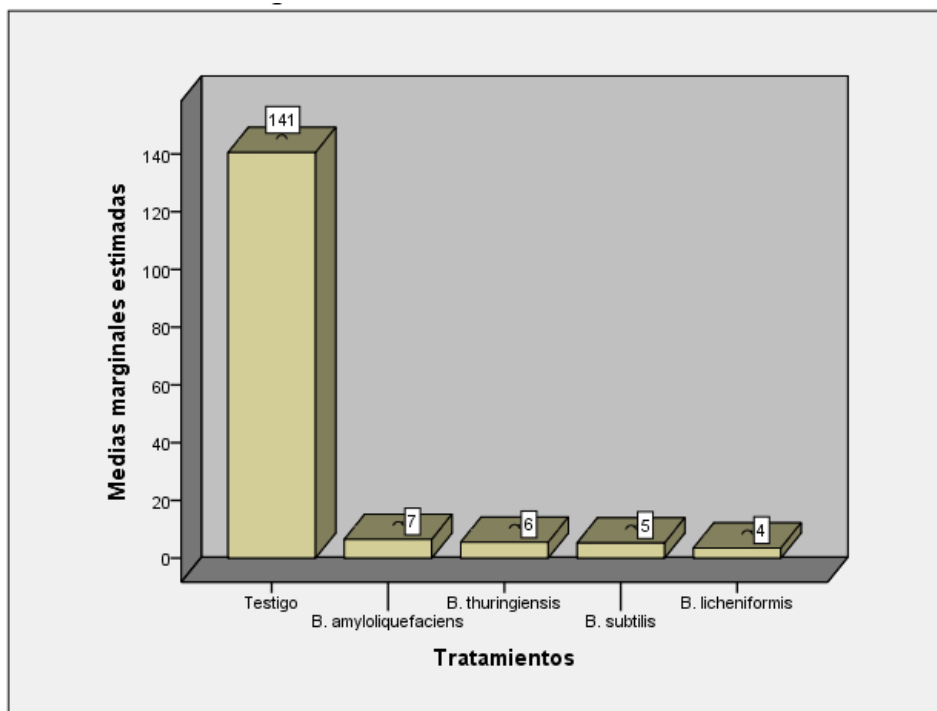


Figura 14. Medias estimadas de Eclosión de huevos libres

Los resultados del test de Duncan (Cuadro 9.) muestran la formación de 2 subconjuntos, desde el menor al mayor número de juveniles emergidos y donde:

- Subconjunto 1: formado por *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* con un media de 3,50; 5,25; 5,50 y 6,50 respectivamente por ser estadísticamente similares.
- Subconjunto 2: Testigo

En el cuadro 9 y figura 14 se observan que todas las cepas de *Bacillus spp.* tienen un efecto similar en la eclosión de huevos por lo que el programa las agrupo en el mismo subconjunto, lo que nos indica que cualquiera de las

cepas de *Bacillus* estudiadas que usemos tendrán el mismo efecto en el control de la eclosión de huevos.

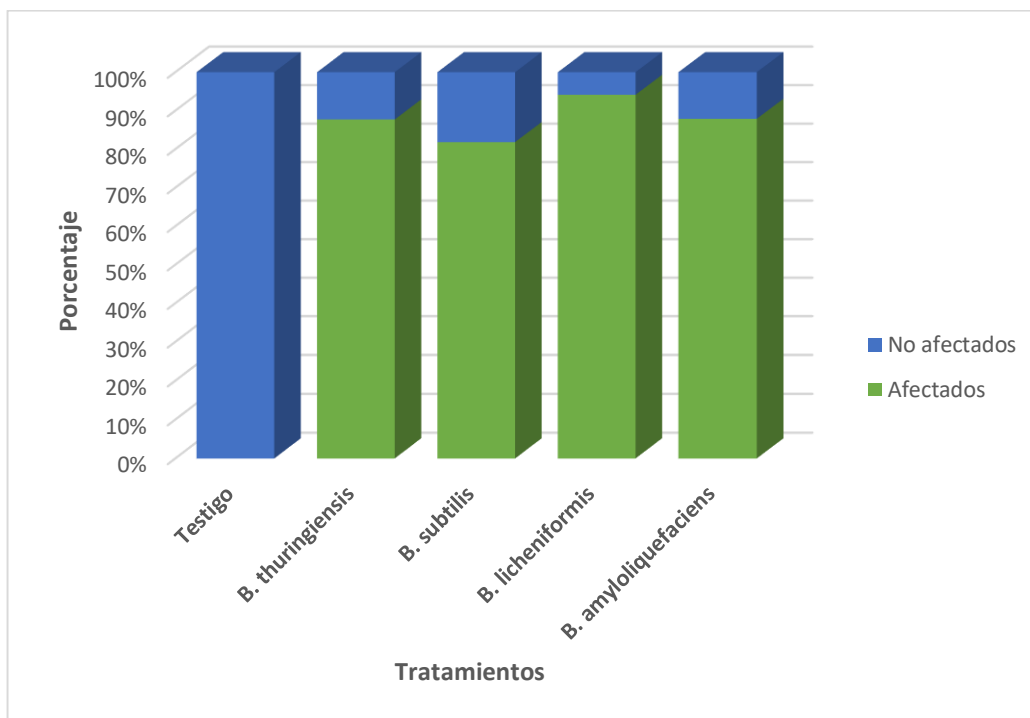


Figura 15. Porcentaje de J2 eclosionados de huevos libres

En la figura 15, se muestra el porcentaje de juveniles eclosionados después de haber sido colocados en agua. Se observó que incluso después de retirar los huevos libres de los tratamientos y colocarlos en agua por un periodo de tres días, se logró un control efectivo con cada una de las Cepa con el respectivo porcentaje, *B. thuringiensis* (88%), *B. subtilis* (82%), *B. licheniformis* (94%) y *B. amyloliquefaciens* (88%)

4.3. PRUEBA DE MOVIMIENTO DE JUVENILES J2

En esta prueba *in vitro* los resultados se expresaron como el número de individuos que lograron atravesar el papel facial.

El tratamiento testigo (agua), presento el mayor número promedio de Juveniles que lograron atravesar el papel facial al no existir ningún control.

Los resultados obtenidos se encuentran en el Anexo 3.

Cuadro 10. Análisis de varianza - Movimiento J2

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	16650,500 ^a	4	4162,625	35,147	,000
Interceptación	214245,000	1	214245,000	1808,992	,000
Tratamiento	16650,500	4	4162,625	35,147	,000
Error	1776,500	15	118,433		
Total	232672,000	20			
Total corregido	18427,000	19			

CV=10.51% Promedio(\bar{X}) = 103.5

Según el cuadro 10, se puede observar que la significancia de la variable Tratamiento es menor a 0.05, por lo tanto, existe diferencia significativa, por lo que se procedió a realizar el test de Dunnet y posteriormente, el test de Duncan.

Cuadro 11. Test de Dunnett - Movimiento J2

	(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
				Límite superior
T de Dunnett (<control) ^a	B. thuringiensis	Testigo	,215	6,88
	B. subtilis	Testigo	,000	-65,37
	B. licheniformis	Testigo	,001	-15,62
	B. amyloliquefaciens	Testigo	,012	-5,87

Los resultados de la prueba de Dunnett (Cuadro11), se puede observar que la cepa de *Bacillus thuringiensis* en comparación con el testigo no tiene efecto significativo en el movimiento de juveniles a comparación de las otras cepas que si ejercen efecto significativo.

Cuadro 12. Test de Duncan - Movimiento J2

Tratamientos	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
Duncan ^{a,b} B. subtilis	4	50,50			
B. licheniformis	4		100,25		
B. amyloliquefaciens	4		110,00	110,00	
B. thuringiensis	4			122,75	122,75
Testigo	4				134,00
Sig.		1,000	,224	,118	,164

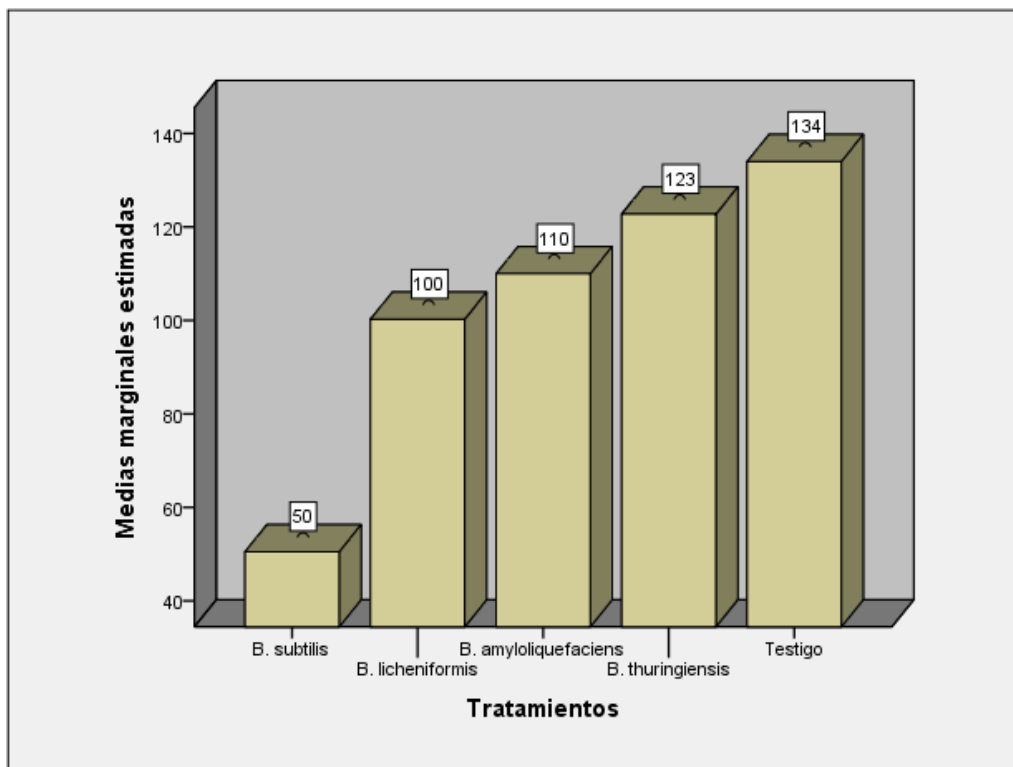


Figura 16. Medias estimadas de Movimiento de Juveniles J2

Los resultados del test de Duncan (Cuadro 12.) muestran la formación de 4 subconjuntos, desde el menor al mayor número de juveniles que presentan movimiento donde:

- Subconjunto 1: formado por *B. subtilis* con una media de 50,50.
- Subconjunto 2: formado por *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* con una media de 100,25 y 110,00 respectivamente.
- Subconjunto 3: formado por *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* con una media de 110,00 y 122,75 respectivamente
- Subconjunto 4: formado por *B. thuringiensis* con una media 122,75

En el cuadro 12 y figura 9 se observan que las cepas de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* tienen un efecto similar en el movimiento de juveniles y que la cepa de *Bacillus subtilis* es el que mejor efecto de control tiene.

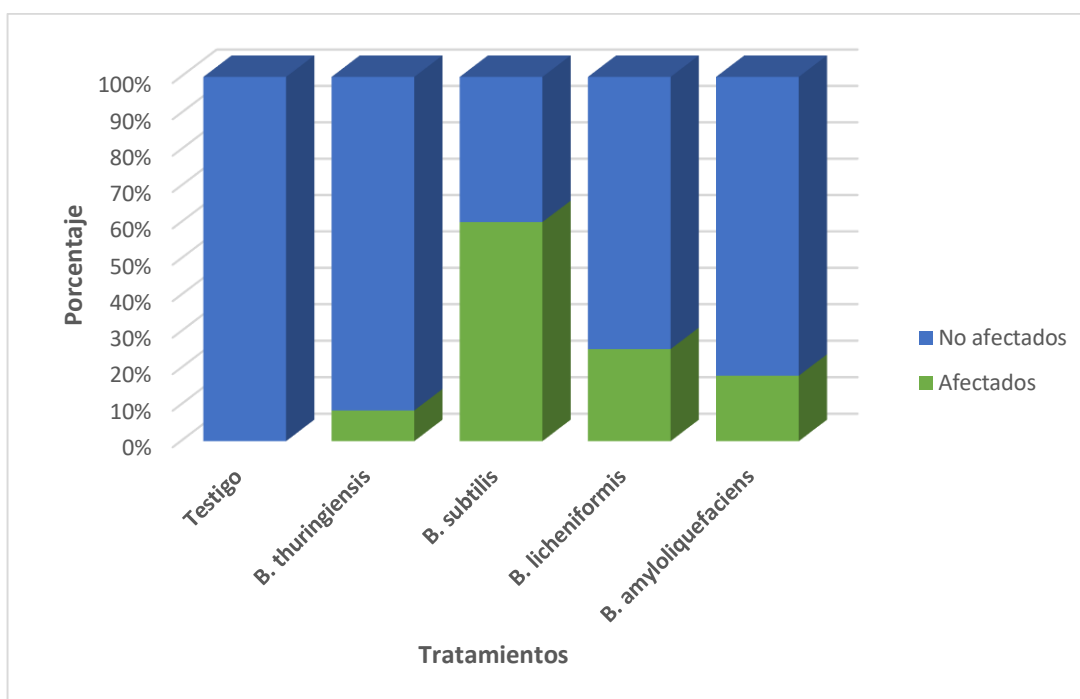


Figura 17. Porcentaje de J2 móviles de *Meloidogyne* spp.

En la figura 17 se muestra el porcentaje de nematodos afectados y no afectados expuestos a los tratamientos y posteriormente puestos en agua; en el se aprecia que el efecto supresor de las cepas antes mencionadas (*B. thuringiensis* con 8 %, *B. licheniformis* con 25 % y *B. amyloliquefaciens* con 18 %) es menor al de las pruebas anteriores y que la cepa que ofrece un mayor control es *Bacillus subtilis* con un 60 % de efectividad.

V. DISCUSIÓN

5.1. PRUEBA DE EMERGENCIA DE JUVENILES J2 DE LA MASA DE HUEVOS

En el Cuadro 6 y Figura 12 se observan que las cepas de *Bacillus thuringiensis* y *subtilis* son los tratamientos que tienen un menor número de juveniles emergidos de la masa de huevos, seguido por *Bacillus licheniformis*. Resultados similares a los hallados por Márquez *et al* (2003), indica que *B. thuringiensis* demuestra una alta efectividad debido a la combinación de esporas y cristales tóxicos responsables de la actividad ovicida, con lo que respecta a *B. licheniformis* se ha señalado que existe un efecto combinado de naturaleza enzimática que ejerce su acción sobre la pared de los huevos y que inhibe el proceso de eclosión. La cepa que presentó mayor número de juveniles emergidos fue *Bacillus amyloliquefaciens*.

Los porcentajes de juveniles J2 emergidos y afectados de las masas de huevos (Figura 13) se asemejan a los obtenidos por Márquez *et al* (2003) respecto al porcentaje de control de *Bacillus thuringiensis* y *B. licheniformis* obteniendo un 88 % y 82,9 % en la reducción de la eclosión en masas de huevos. Jaramillo (2014), también señala una mortandad mayor al 80 % con cepas de *B. thuringiensis* en bioensayos con masas de huevos *in vitro*.

Soto *et al* (2012) señalan que el efecto de *Bacillus subtilis* sobre la población de *Meloidogyne* spp. esta relaciona con la cantidad de esporas inyectadas y la interacción con materia orgánica pudiendo llegar a tener hasta 99 % de efectividad con una aplicación de 1 a 2×10^6 esporas/ml y 30 tn/ha de materia orgánica.

5.2. PRUEBA DE ECLOSIÓN DE HUEVOS LIBRES

A comparación de la prueba anterior en masas de huevo, los resultados obtenidos en esta prueba (Figura 15) se pueden deber a lo señalado por Vera (2014), que indica que la masa gelatinosa que recubre a los huevos; está compuesta por glicoproteínas y se le atribuye propiedades antimicrobiales. Por esta razón al no existir la barrera de defensa para los huevos la acción de control es más efectiva. Esto también es explicado por Márquez *et al* (2003), al indicar que por estudios histoquímicos realizados a la estructura de los huevos de los nematodos, se conoce que está formada por una fina membrana interna compuesta de lípidos, seguido por una cubierta de quitina y por fuera una cubierta proteica; que al interactuar con las enzimas generadas por las cepas de *Bacillus* sobre la pared de los huevos inhibe el proceso de eclosión.

5.3. PRUEBA DE MOVIMIENTO DE JUVENILES J2

Información que se asemeja al presentado por Palacios (2013), señala que en las tres dosis (1; 2 y 3 lt/ha) de *B. subtilis* aplicadas sobre juveniles 2 de *Meloidogyne incognita* en condiciones de invernadero logró un control de (64,09 %; 63,81 % y 74,32 %) respectivamente.

Con respecto al poco control que demostró *B. thuringiensis* en esta prueba, Jaramillo (2014) informa que de las 23 cepas de *B. thuringiensis* estudiadas, solo 14 demostraron una buena actividad nematocida superior a 60,86 % en el bioensayo *in vitro* contra J2 de *Meloidogyne incognita* en 24 horas. Las 9 cepas restantes fueron descartadas debido a una mortalidad inferior al 60 % (12 %, 22 %, 16 %, 45 %, 33 %, 30 %, 18 %, 15 % y 10 %).

VI. CONCLUSIONES

- Respecto a las pruebas en condiciones *in vitro* sobre *Meloidogyne* spp., la cepa de *Bacillus subtilis* fue la única que demostró efectividad en las tres pruebas realizadas (emergencia, eclosión y movimiento de juveniles) mientras que *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus licheniformis* demostraron tener una alta inhibición en la emergencia y eclosión de huevos, su efecto es menor en la supresión del movimiento de juveniles J2, a comparación de *Bacillus amyloliquefaciens* que tiene un número elevado de J2 emergidos de las masas de huevos y movimiento de J2, sin embargo, tiene una efectividad en la inhibición de huevos libres.
- En la prueba de emergencia de juveniles J2 de las masas de huevos, la cepa *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* formaron el primer subconjunto, al demostraron tener mayor efectividad y ser las mejores opciones de control en comparación con los demás tratamientos.
- En la prueba de eclosión de huevos, todas las cepas de *Bacillus* spp. demostraron afectar significativamente la eclosión y ser estadísticamente similares a diferencia del Testigo, por ellos todas se encuentran ubicadas en un mismo subconjunto siendo cualquiera de ellas una buena opción de control.

- En la prueba de movimiento, *Bacillus subtilis* demostró ser la más efectiva para suprimir el movimiento de los juveniles y lograr un mayor porcentaje de juveniles afectados.

VII. RECOMENDACIONES

- En caso de realizar ensayos de enfrentamiento *in vitro* con productos biológicos se recomienda realizar las evaluaciones cada 24 horas de exposición a los tratamientos para facilitar los recuentos y evitar el enturbiamiento por microorganismos ambientales.
- Comprobar la efectividad combinadas de las cepas *Bacillus thuringiensis*, *licheniformis* y *subtilis* para próximas investigaciones.
- Probar los mejores tratamientos a nivel de invernadero y campo para confirmar su efectividad en el control poblacional de *Meloidogyne* spp.

VIII. LITERATURA CITADA

Agrios, G. 2005. Fitopatología. 5ª Ed. México. Limusa. 723 p.

Calvo, P; Zúñiga, D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*). Revista de Ecología aplicada 9(1): 31-39.

Canto, M. 2010. Separata del Curso de Nematología Agrícola: *Meloidogyne sp.* Lima, Perú. Escuela de Postgrado, Especialidad de Fitopatología. 48 p.

Farfán, M. 2011. Comportamiento del nemátodo del nódulo *Meloidogyne incognita* (kofoid & White, 1919) chitwood, 1949 con 12 productos químicos. Tesis Mg. Sc. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 64 p.

Hidalgo, D. 2008. Actividad nematocida sobre *Meloidogyne hapla* de extractos acuosos de especies arbóreas y arbustivas de la zona sur de Chile [En línea]. Tesis Lic. Valdivia, Chile. Universidad Austral De Chile. <<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fah632a/doc/fah632a.pdf>> [Consultado: 10 Noviembre 2017].

IITA (Instituto Internacional de Agricultura Tropical); CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo). 2009. Nematología

práctica: Una guía de campo y laboratorio. reimpr. Green Ink Publishing Services. S.l. 83 p.

Isla, F. 2016. Control biológico del *Meloidogyne incognita* en Aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) por bacterias promotoras de crecimiento y hongos endomicorrízicos. Tesis Blgo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 114 p.

Jaramillo, J. 2014. Evaluación de la actividad nematocida de cepas nativas de colección de *Bacillus thuringiensis* contra el nematodo formador de nódulos de la raíz (*Meloidogyne incognita*). Tesis Dr. Universidad Autónoma De Nueva León. Facultad De Ciencias Biológicas. México. 75p

López, J. 2017. Evaluación de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre incidencia de *Fusarium oxysporum* en arveja china. Tesis Ing. Agr. Universidad Rafael Landívar. Guatemala. 35p.

Márquez, M; Fernandez, E. 2006. Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* con efecto nematocida [En línea]. Costa Rica. < <http://www.sidalc.net/reprodoc/A1842e/A1842e.pdf>> [consultado: 16 Noviembre 2018].

Márquez, M; Torres, L; Escobar, M. 2003. Evaluación del efecto nematocida de cepas de *Bacillus spp.* [En línea]. Instituto de Investigación de sanidad Vegetal (Fitopatología) 7(2):55-58. < <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209118162009.pdf>> [consultado: 03 Octubre 2018].

Ministerio de Agricultura de Chile. 2010. Bacterias nativas para el control de nematodos fitoparásitos [En línea]. Chile. < https://www.opia.cl/static/website601/articles75506_archivo_01.pdf> [Consultado: 21 Agosto 2018].

Moncada, R. 2014. Evaluación de extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0123 para la recuperación de suelos bananeros contaminados con *Ralstonia solanacearum* [En línea]. Medellín, Colombia. < https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/2860/RuthNatalia_MoncadaOssa_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [consultado: 10 Enero 2019].

Montgomery, D; Hines, W. 1996. Probabilidad y estadística para ingeniería y administración [En línea]. México. <<http://148.206.53.84/tesiuami/Libros/L50.pdf>> [consultado: 16 Enero 2018]

Orberá, T; Pérez, I; Ferrer, D; Cortés; Gonzales, Z. 2005. Aislamiento de cepas del genero *Bacillus* spp. con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal [En línea]. Santiago de Cuba, Cuba. <www.researchgate.net/publication/230079187_AISLAMIENTO_DE_CEPAS_DEL_GENERO_BACILLUS_SP_PARA_LA_BIOPROTECCION_Y_LA_ESTIMULACION_DEL_CRECIMIENTO_VEGETAL> [consultado: 10 Enero 2019].

Palacios, A. 2013. Efecto de *Bacillus subtilis* sobre juveniles 2 de *Meloidogyne incognita* en condiciones de invernadero en el Fundo Marverde de la

- Empresa Camposol. Tesis Blgo. Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo. 46 p.
- Pascual, M. 2013. Aislamiento y purificación de metabolitos de *Bacillus licheniformis* y *Trichoderma harzianum* con potencial nematocida. Tesis Ing. Agr. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila, México. 67p.
- Peregrín, M. 2013. Uso de agentes de control y protección biológica frente a nematodos del genero *Meloidogyne* en cultivos protegidos bajo plástico [En línea]. Tesis Dr. Granada, España. Universidad de Granada. < <http://0hera.ugr.es. adrastea.ugr.es/tesisugr/21862369.pdf>> [consultado: 9 Octubre 2018].
- Piedra, R. 2008. Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias [En línea]. Revista Tecnología en Marcha. 21(1): 123-132. < <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4835677.pdf>> [consultado: 15 Julio 2017].
- Requena, A. 2013. Control biológico de *Meloidogyne incognita* en pimiento (*Capsicum annuum*) [En línea]. Tesis Dr. Cartagena, Colombia. Universidad Politécnica de Cartagena. < <http://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/4019/amrc.pdf?sequence=1>> [consultado: 20 Enero 2018]
- Saire, L. 2017. Productos químicos alternativos e ingredientes activos comercialmente nuevos para el control de *Meloidogyne incognita* en tomate

en invernadero. Tesis Ing. Agr. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 121p.

Sánchez, I. 2006. Determinación de la época óptima de aplicación de nemacur y extracto de quillay, para el control de *Meloidogyne spp.* en cinco estados fenológicos de vid cv. Chardonnay [en línea]. Tesis Ing. Agr. Santiago, Chile. Universidad De Chile. < http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/101845/sanchez_i.pdf?sequence=4> [consultado: 18 Mayo 2018]

Soria, M; Ferrera-Cerrato, R; Etchevers, J; Alcántar, G; Tinidad, J; Borges, L; Pereyra, G. 2001. Producción de biofertilizantes mediante biodigestión de excreta líquida de cerdo [En línea]. < [https://www.chapingo.mx/terra/contenido/19/4/art 353-362.pdf](https://www.chapingo.mx/terra/contenido/19/4/art%20353-362.pdf)> [consultado: 16 Octubre 2017]

Soto, N; López, S; Murguía, C. 2012. Eficacia de la cepa nativa de *Bacillus subtilis* como agente supresor del nematodo del nudo *Meloidogyne spp.* en cultivo de *Capsicum annum* (ají pimiento piquillo) [En línea]. < [file:///C:/Users/OFFICINAXX/Downloads/DialnetEficaciaDeCepaNativaDeBacillusSubtilisComoAgenteSu-4227009%20\(7\).pdf](file:///C:/Users/OFFICINAXX/Downloads/DialnetEficaciaDeCepaNativaDeBacillusSubtilisComoAgenteSu-4227009%20(7).pdf) > [consultado: 09 Diciembre 2018].

Subercaseaux, M. 2011. Efecto nematocida sobre *Meloidogyne hapla* Chitwood 1949, del tejido foliar de especies arbóreas [en línea]. Tesis Ing.

Chile. Universidad Austral de Chile. < http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2011/fas967e/doc/fas_967e.pdf> [consultado: 15 Julio 2017].

Talavera, M. 2003. Manual de Nematología agrícola. Introducción al análisis y al control nematológico para agricultores y técnicos de agrupaciones de defensa vegetal [En línea]. < <http://www.caib.es/sacmicrofront/archivopub.do?ctrl=CNTSP722ZI4569&id=4569>> [consultado: 21 Octubre 2018].

Torres, J. 2013. Estudio de la efectividad de organismos biológicos, para el control del nematodo agallador *Meloidogyne incognita* en papa *Solanum tuberosum* L., bajo condiciones de laboratorio y en tomate *Lycopersicon esculentum*, bajo condiciones de invernadero. Tesis Ing. Agr. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Dpto. Parasitología. Coahuila, México. 80p.

Vera, N. 2014. Técnica molecular de PCR para identificar las principales especies de *Meloidogyne spp.* en poblaciones provenientes del Perú. Tesis MSc. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. 93p.

ANEXO

Cuadro 13. Cuadro de datos de la emergencia de juveniles de las masas de huevos.

	REPETICIÓN	1° EVALUACIÓN	2° EVALUACIÓN	3°. EVALUACIÓN	TOTAL	EVALUACIÓN EN AGUA
Testigo	1	63	63	115	241	0
Testigo	2	228	2	40	270	0
Testigo	3	91	85	87	263	0
Testigo	4	180	0	82	262	0
B. thuringiensis	1	0	0	0	0	9
B. thuringiensis	2	0	0	0	0	6
B. thuringiensis	3	16	0	0	16	10
B. thuringiensis	4	14	0	0	14	0
B. subtilis	1	19	0	0	19	3
B. subtilis	2	23	0	0	23	3
B. subtilis	3	4	0	0	4	7
B. subtilis	4	30	0	0	30	6
B. licheniformis	1	29	0	0	29	7
B. licheniformis	2	38	0	0	38	10
B. licheniformis	3	33	0	0	33	8
B. licheniformis	4	42	0	0	42	4
B. amyloliquefaciens	1	156	0	0	156	7
B. amyloliquefaciens	2	175	0	0	175	3
B. amyloliquefaciens	3	191	0	0	191	0
B. amyloliquefaciens	4	169	0	0	169	4

Cuadro 14. Datos de la eclosión de huevos libres

	REPETICIÓN	1° EVALUACIÓN	2° EVALUACIÓN	3°. EVALUACIÓN	TOTAL	EVALUACIÓN EN AGUA
Testigo	1	6	8	131	145	0
Testigo	2	11	15	111	137	0
Testigo	3	10	16	124	150	0
Testigo	4	15	6	109	130	0
B. thuringiensis	1	8	0	0	8	11
B. thuringiensis	2	3	0	0	3	13
B. thuringiensis	3	7	0	0	7	9
B. thuringiensis	4	4	0	0	4	14
B. subtilis	1	0	0	0	0	0
B. subtilis	2	5	0	0	5	19
B. subtilis	3	2	0	0	2	33
B. subtilis	4	14	0	0	14	29
B. licheniformis	1	0	0	0	0	3
B. licheniformis	2	0	0	0	0	13
B. licheniformis	3	10	0	0	10	1
B. licheniformis	4	4	0	0	4	2
B. amyloliquefaciens	1	7	0	0	7	14
B. amyloliquefaciens	2	3	0	0	3	2
B. amyloliquefaciens	3	10	0	0	10	19
B. amyloliquefaciens	4	6	0	0	6	7

Cuadro 15. Datos del movimiento de Juveniles J2

	REPETICIÓN	1° EVALUACIÓN	2° EVALUACIÓN	3°. EVALUACIÓN	TOTAL	EVALUACIÓN EN AGUA
Testigo	1	136	7	1	144	0
Testigo	2	119	12	0	131	0
Testigo	3	121	12	1	134	0
Testigo	4	115	12	0	127	0
B. thuringiensis	1	113	4	0	117	0
B. thuringiensis	2	120	4	0	124	0
B. thuringiensis	3	103	6	0	109	0
B. thuringiensis	4	134	7	0	141	0
B. subtilis	1	20	43	0	63	0
B. subtilis	2	38	0	0	38	0
B. subtilis	3	35	29	0	64	1
B. subtilis	4	35	2	0	37	11
B. licheniformis	1	103	0	0	103	0
B. licheniformis	2	111	0	0	111	0
B. licheniformis	3	99	0	0	99	0
B. licheniformis	4	88	0	0	88	0
B. amyloliquefaciens	1	103	0	0	103	0
B. amyloliquefaciens	2	107	0	0	107	0
B. amyloliquefaciens	3	116	0	0	116	0
B. amyloliquefaciens	4	114	0	0	114	0

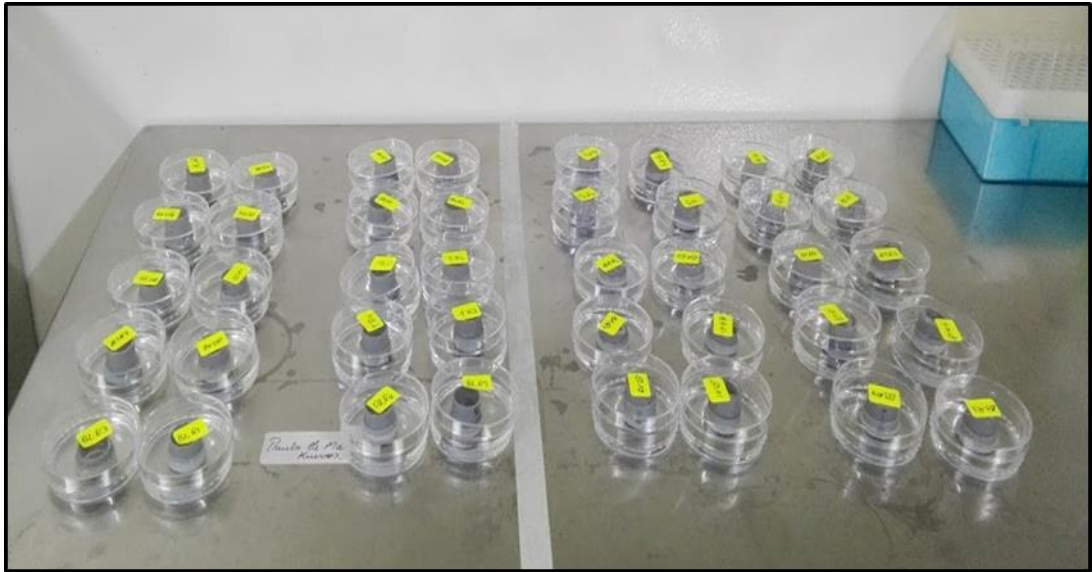


Figura 18. Instalación del ensayo *in vitro*

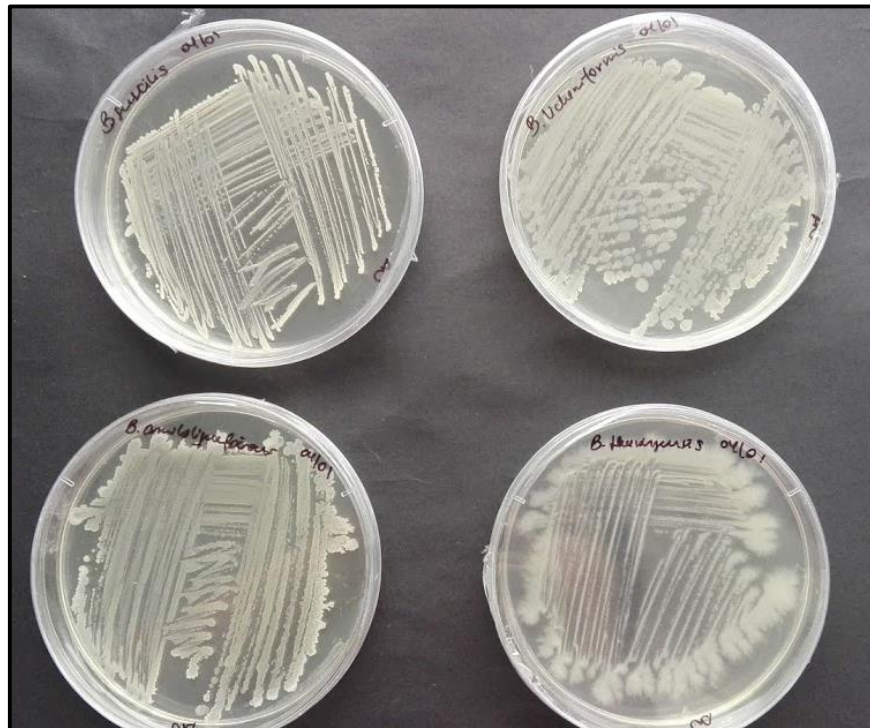


Figura 19. Cepas de *Bacillus* spp.



Figura 20. Multiplicación del inóculo de *Bacillus spp.*



Figura 21. Diluciones sucesivas

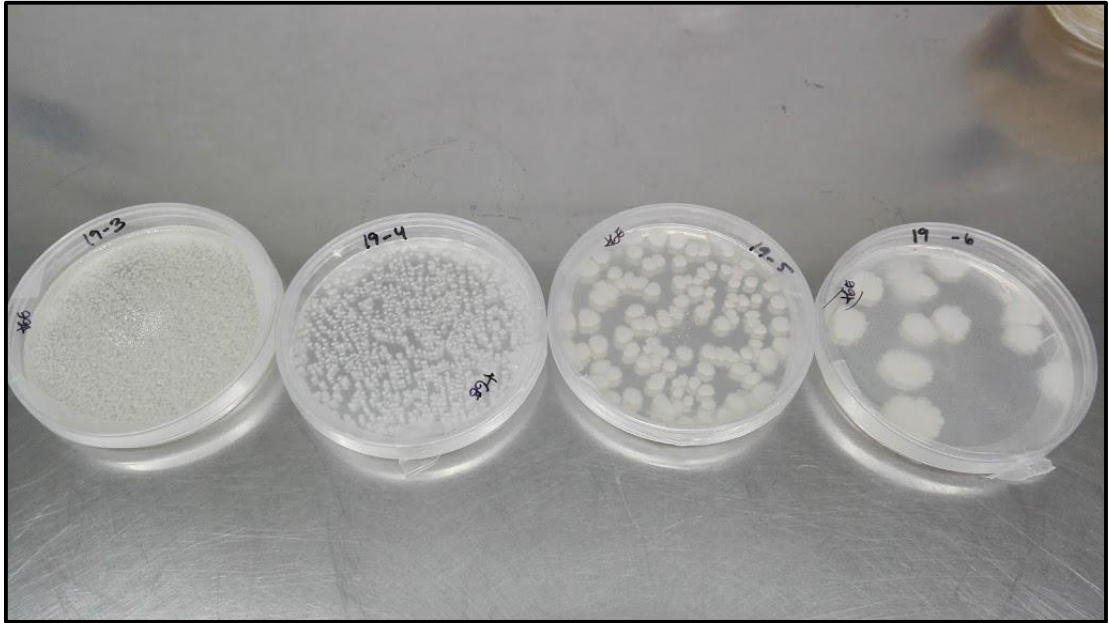


Figura 22. Recuento de las diluciones en placa.



Figura 23. Materiales para el ensayo *in vitro*

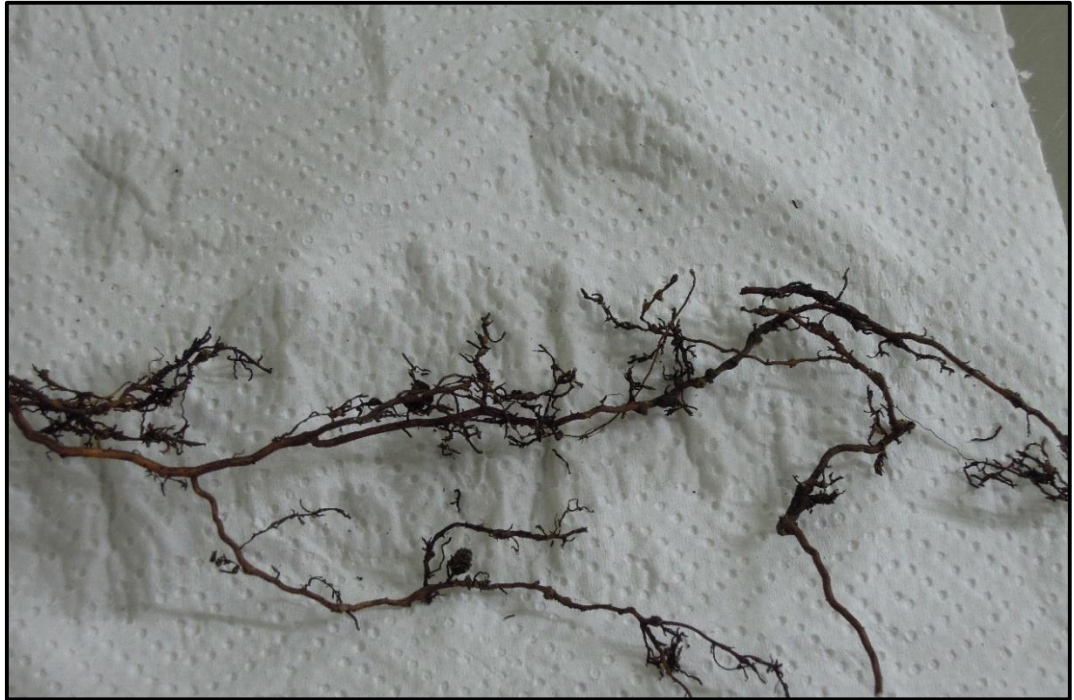


Figura 24. Raíz de vid con nódulos.



Figura 25. Nódulos con masas de huevos.

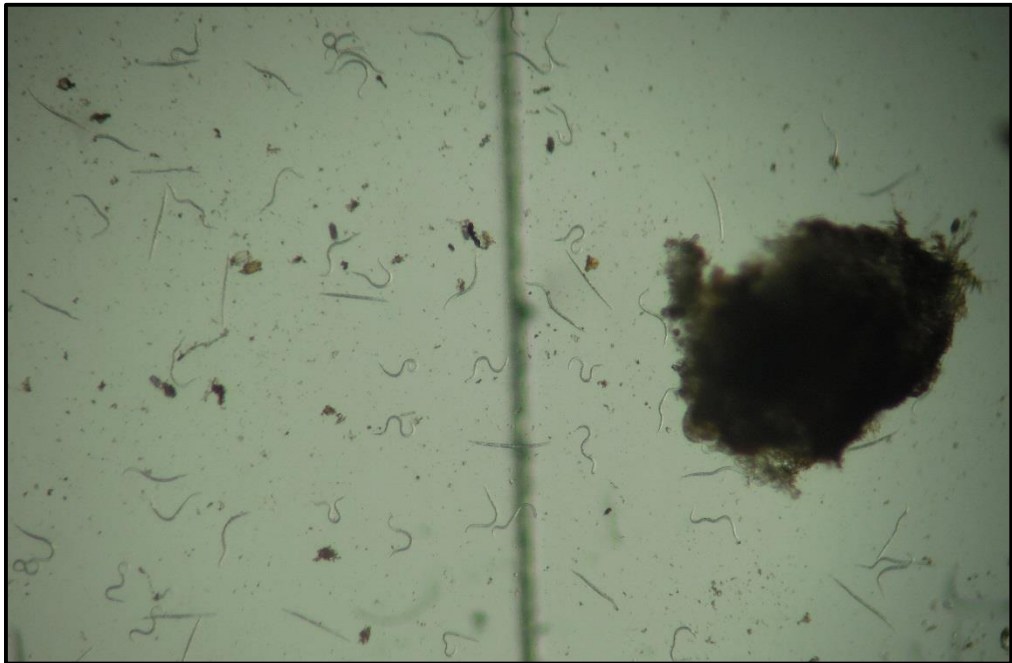


Figura 26. Juveniles emergidos de la masa de huevos



UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZAN - HUANUCO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRONOMO.

En la ciudad de Huánuco a los 03 días del mes de Abril del año 2019, siendo las 10:30 horas con 30 minutos de acuerdo al Reglamento de Grado Académico y Título Profesional de la Facultad de Ciencias Agrarias, se reunieron en la Sala Magna de la Facultad de Ciencias Agrarias de la **UNHEVAL**, los miembros integrantes del Jurado Calificador, nombrados mediante Resolución N° 0132 – 2019 - UNHEVAL/FCA-D de fecha 27/03/2019, para proceder con la evaluación de la sustentación de la tesis titulada: **“CEPAS DE *Bacillus spp* EN EL CONTROL DE *Meloidogyne spp* EN CONDICIONES INVITRO”** Presentada por la Bachiller en Ciencias Agrarias **GIANNELLA JESSICA INGRID RICALDI MIRAVAL** Bajo el asesoramiento del. Ing. EDWIN VIDAL JAIMES. El Jurado Calificador está integrado por los siguientes docentes:

- PRESIDENTE** : Dr. RUBEN LIMAYLLA JURADO
- SECRETARIO** : Ing. FLELI RICARDO JARA CLAUDIO
- VOCAL** : Dra. MARIA BETZABE GUTIERREZ SOLORZANO
- ACCESITARIO** : Ing. GRIFELIO VARGAS GARCIA

Finalizado el acto de sustentación, luego de la deliberación y verificación del calificativo por el Jurado, se obtuvo el siguiente resultado: Aprobado por Unanimidad con el cuantitativo de 18 y cualitativo de muy bueno, quedando el sustentante Apto. para que se le expida el **TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRONOMO.**

El acto de sustentación se dio por concluido, siendo las 12:15 horas.

Huánuco, 03 de abril del 2019

[Firma]
PRESIDENTE

[Firma]
SECRETARIO

[Firma]
VOCAL

- Deficiente (11, 12, 13) Desaprobado
- Bueno (14, 15, 16) Aprobado
- Muy Bueno (17, 18) Aprobado
- Excelente (19, 20) Aprobado

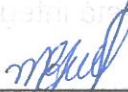
OBSERVACIONES:

El secretario Luz Fleli Toros Claudio desistió de la
sustentación de acuerdo al reglamento del PROACTIP
por cuanto fue docente de la mencionada sustentante
y asumió el Asesorio como Vocal y el vocal como
secretaría


Huánuco, 03 de abril - del 2019



PRESIDENTE



SECRETARIO



VOCAL

LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES:

Huánuco, 03 de abril del 2019

PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZAN		REGLAMENTO DE REGISTRO DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR GRADOS ACÁDEMICOS Y TÍTULOS PROFESIONALES			
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN		RESPONSABLE DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL UNHEVAL	VERSION	FECHA	PAGINA
		OFICINA DE BIBLIOTECA CENTRAL	0.0	06/01/2017	1 de 2

ANEXO 2

AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN DE TESIS ELECTRÓNICAS DE PREGRADO

1. IDENTIFICACIÓN PERSONAL (especificar los datos de los autores de la tesis)

Apellidos y Nombres: RICALDI MIRAVAL GIMINELLA JESSICA INGEN

DNI: 45370626 Correo electrónico: _____

Teléfonos: Casa _____ Celular 976117438 Oficina _____

Apellidos y Nombres: _____

DNI: _____ Correo electrónico: _____

Teléfonos: Casa _____ Celular _____ Oficina _____

Apellidos y Nombres: _____

DNI: _____ Correo electrónico: _____

Teléfonos: Casa _____ Celular _____ Oficina _____

2. IDENTIFICACIÓN DE LA TESIS

Pregrado	
Facultad de:	<u>CIENCIAS AGRARIAS</u>
E. P. :	<u>INGENIERIA AGRONÓMICA</u>

Título Profesional obtenido:

INGENIERO AGRONOMO

Título de la tesis:

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN	UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZAN		REGLAMENTO DE REGISTRO DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR GRADOS ACÁDEMICOS Y TÍTULOS PROFESIONALES		
	RESPONSABLE DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL UNHEVAL	VERSION	FECHA	PAGINA	
	OFICINA DE BIBLIOTECA CENTRAL	0.0	06/01/2017	2 de 2	

CAPAS DE BACILLUS SPP. EN EL CONTROL DE
MELOIDOGYAE SPP. EN CONDICIONES in Vitro.

Tipo de acceso que autoriza(n) el (los) autor(es):

Marcar "X"	Categoría de Acceso	Descripción del Acceso
<input checked="" type="checkbox"/>	PÚBLICO	Es público y accesible al documento a texto completo por cualquier tipo de usuario que consulta el repositorio.
<input type="checkbox"/>	RESTRINGIDO	Solo permite el acceso al registro del metadato con información básica, más no al texto completo

Al elegir la opción "Público", a través de la presente autorizo o autorizamos de manera gratuita al Repositorio Institucional – UNHEVAL, a publicar la versión electrónica de esta tesis en el Portal Web repositorio.unheval.edu.pe, por un plazo indefinido, consintiendo que con dicha autorización cualquier tercero podrá acceder a dichas páginas de manera gratuita, pudiendo revisarla, imprimirla o grabarla, siempre y cuando se respete la autoría y sea citada correctamente.

En caso haya(n) marcado la opción "Restringido", por favor detallar las razones por las que se eligió este tipo de acceso:

Asimismo, pedimos indicar el período de tiempo en que la tesis tendría el tipo de acceso restringido:

- () 1 año
- () 2 años
- () 3 años
- () 4 años

Luego del período señalado por usted(es), automáticamente la tesis pasará a ser de acceso público.

Fecha de firma:

Firma del autor y/o autores:

