



**“EFECTO DEL QUITOSANO EN LA ACCIÓN PARASITARIA DE
CEPAS NATIVAS DE HONGOS NEMATÓFAGOS ENDÓFITOS
FRENTE AL NEMATODO CEBO *Steinernema australe*”**

Memoria para optar al título de Bioquímico

Bruno Sebastián Contreras Contreras

Directora de Memoria: Dra. Lorena Barra Bucarei

Profesor patrocinante: Dr. Carlos A. Santiviago

Laboratorio de Bioprocesos, Banco de Recursos Genéticos Microbianos, Instituto de
Investigaciones Agropecuarias

Chillán, Chile

2022

Esta Memoria de Título se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos del Banco de Recursos Genéticos Microbianos del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias y fue financiada por el Proyecto 502906-70 de la Subsecretaría de Agricultura dirigido por la Dra. Lorena Barra Bucarei.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco, en primer lugar, a mis padres. Por su amor y apoyo incondicional a lo largo de este proceso y durante toda mi vida. Confortándome y animándome en cada momento. Los amo mucho, Carol y Carlos.

Doy gracias a todo el equipo del laboratorio de Bioprocesos y a todo el personal del Banco de Recursos Genéticos Microbianos por su paciencia, dedicación, confianza y disposición. Quiero agradecer especialmente a la Dra. Lorena Barra por la dirección de mi Memoria de Título, a Javiera Ortiz, Patricio Parra y Karen Parra por siempre estar presentes y abiertos a compartir sus conocimientos conmigo. También agradezco a Jorge Carrasco y Viviana Cisternas por todo lo enseñado. Gracias por haber sido parte de esta etapa. Igualmente, equipo del Laboratorio de Nematología por facilitar los nematodos, especialmente a la Sra. Dina Navarrete.

Finalmente, agradezco a mis amigos y a toda la gente que conocí a través de los años durante mi formación académica y humana.

1. PRESENTACIONES EN SIMPOSIOS Y CONGRESOS DERIVADAS DE ESTA MEMORIA DE TÍTULO

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

Contreras B, Barra-Bucarei L., Ortiz J., Parra K. y Parra P. “Efecto del quitosano en la acción parasitaria de cepas nativas de hongos nematófagos endófitos frente al nematodo cebo *Steinernema australe*”. V Simposio Chileno de Control Biológico, 30 de agosto al 1 de septiembre de 2022. Chile.

Ortiz-Campos J., Barra-Bucarei L., Gerding M. Parra K., Castillo P. y **Contreras B**. “Hongos entomopatógenos: Potencial como nematófagos endófitos”. II Workshop de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agronómicas, 11 y 12 de enero de 2022. Termas de Catillo, Parral, Chile.

Ortiz-Campos J., Barra-Bucarei L., Gerding M. Parra K., Castillo P. y **Contreras B**. “Hongos endófitos y su potencial como biocontroladores de nematodos fitoparásitos en tomate”. XIII Simposio Internacional de Recursos Genéticos para las Américas y el Caribe (SIRGEAC), 30 de noviembre al 3 de diciembre de 2021, Colombia.

2. ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. PRESENTACIONES EN SIMPOSIOS Y CONGRESOS DERIVADAS DE ESTA MEMORIA DE TÍTULO.....	iv
2. ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
3. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	vii
4. ABREVIATURAS.....	ix
5. RESUMEN	xi
6. SUMMARY.....	xiv
7. INTRODUCCIÓN	1
7.1 El tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	1
7.2 Nematodos fitopatógenos	1
7.3 Hongos nematófagos.....	4
7.4 Hongos endófitos	4
7.5 Géneros de hongos endófitos nematófagos	5
7.6 Quitosano como estimulante del parasitismo de hongos nematófagos sobre nematodos fitopatógenos	8
8. HIPÓTESIS	10
9. OBJETIVOS.....	11
9.1 Objetivo general.....	11
9.2 Objetivos específicos	11
10. MATERIALES Y METODOLOGÍAS	Error! Bookmark not defined.
10.1 Materiales y reactivos	12
10.2 Microorganismos.....	12
10.3 Identificación molecular de cepas fúngicas a nivel de especie	13
10.4 Ensayo de colonización endofítica y reislamiento de hongos endófitos en tomate.....	18
10.5 Ensayo de crecimiento fúngico en presencia de quitosano	19
10.6 Evaluación de parasitismo fúngico <i>in vitro</i> de <i>Steinernema australe</i> en presencia de quitosano	21
11. RESULTADOS	23
11.1 Identificación molecular de cepas fúngicas a nivel de especie	23

11.2 Colonización endofítica de cepas nematófagas en tomate.....	29
11.3 Efecto del quitosano en el crecimiento fúngico.....	30
11.4 Parasitismo <i>in vitro</i> de <i>Steinernema australe</i> en presencia de quitosano	36
12. DISCUSIÓN	42
12.1 Colonización endofítica en tomate de cepas fúngicas nematófagas	42
12.2 Crecimiento fúngico en presencia de quitosano	43
12.3 Parasitismo fúngico <i>in vitro</i> de <i>Steinernema australe</i> en presencia de quitosano.....	46
12.4 Proyecciones	47
13. CONCLUSIONES	49
14. REFERENCIAS	50

3. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Microorganismos utilizados en esta Memoria de Título	13
Tabla 2. Partidores utilizados para cada región génica e intergénica en análisis <i>multi-locus</i>	14
Tabla 3. Programas de amplificación por PCR usados para cada pareja de partidores.	16
Tabla 4. Tratamientos utilizados en ensayo de crecimiento fúngico en presencia de quitosano.....	20
Tabla 5. Tratamientos utilizados en ensayo de parasitismo fúngico <i>in vitro</i> sobre <i>S. australe</i> en presencia de quitosano	22

FIGURAS

Figura 1. Acción del quitosano en conjunto con HNs	9
Figura 2. Árbol filogenético de <i>Beauveria</i>	24
Figura 3. Árbol filogenético de <i>Metarhizium</i>	25
Figura 4. Árbol filogenético de <i>Paecilomyces</i>	26
Figura 5. Árbol filogenético de <i>Metapochonia</i>	27
Figura 6. Árbol filogenético de <i>Trichoderma</i>	28
Figura 7. Porcentaje de colonización endofítica	30

Figura 8. Crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. JDF1_61-2 sobre quitosano los días 1, 2, 3, 4 y 5 post inoculación.....	31
Figura 9. Crecimiento de <i>B.peruviansis</i> RGM 644 sobre quitosano los días 5, 7, 10, 13 y 15 post inoculación.....	32
Figura 10. Crecimiento de <i>M. rubescens</i> RGM 1600 sobre quitosano los días 5, 7, 10, 13 y 15 post inoculación.....	33
Figura 11. Crecimiento de <i>P. carneus</i> MAU 179 sobre quitosano los días 5, 7, 10, 13 y 15 post inoculación.....	34
Figura 12. Crecimiento de <i>M. brunneum</i> RGM 447 sobre quitosano los días 5, 7, 10, 13 y 15 post inoculación.....	36
Figura 13. Efecto del quitosano en el número de nematodos parasitados por <i>M. brunneum</i> RGM 447.....	37
Figura 14. Efecto del quitosano en el número de nematodos parasitados por <i>P. carneus</i> MAU 179	37
Figura 15. Efecto del quitosano en el número de nematodos parasitados por <i>M. rubescens</i> RGM 1600	38
Figura 16. Efecto del quitosano en el número de nematodos parasitados por <i>Trichoderma</i> sp. JFD1_61-2.....	39
Figura 17. Efecto del quitosano en el número de nematodos parasitados por <i>Beauveria peruviansis</i> RGM 644.....	40
Figura 18. Parasitismo de <i>Trichoderma</i> sp. JDF1_61-2 sobre <i>S. australe</i>	41
Figura 19. Parasitismo <i>B.peruviansis</i> RGM 644 sobre <i>S. australe</i>	41

4. ABREVIATURAS

ADP:	Agar dextrosa de papa
Bea:	<i>Beauveria</i>
Bloc:	Región intergénica nuclear del locus B
Cm:	Cloranfenicol
DUF895:	Región del espaciador intergénico de proteína hipotética
g:	Gramos
HE:	Hongo endófito
HN:	Hongo nematófago
HR:	Humedad relativa
ITS:	Región intergénica del espaciador transcrito interno
<i>nrLSU</i> :	Gen de subunidad grande del ARN ribosomal nuclear
mg:	Miligramos
min:	Minutos
mL:	Mililitros
MLSA:	Análisis de secuencia <i>multi-locus</i>
mm:	Milímetros
NF:	Nematodo fitoparásito
PCR:	Reacción de la polimerasa en cadena
ppm:	Partes por millón
QUI-7,5 x 10 ² ppm:	7,5 x 10 ² ppm de quitosano
QUI-1,5 x 10 ³ ppm:	1,5 x 10 ³ ppm de quitosano
QUI-2,25 x 10 ³ ppm:	2,25 x 10 ³ ppm de quitosano

<i>rpb1</i> :	Gen de subunidad más grande de la ARN polimerasa II
s:	Segundos
nrSSU:	Gen de subunidad pequeña del ARN ribosomal nuclear
TAE:	Solución <i>buffer</i> de Tris, acetato y EDTA
<i>tef1</i> :	Gen de factor de elongación de la traducción 1- α
<i>tub2</i> :	Gen de β -tubulina
μ L:	Microlitros
ng/ μ L:	Nanogramos por microlitro

5. RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es de gran relevancia a nivel global, debido a su aporte nutricional y ser buena fuente de antioxidantes. Es una de las hortalizas más cultivadas en Chile y en el mundo. No obstante, sus cultivos son susceptibles a diversas enfermedades causadas por agentes fitopatógenos. Dentro de éstos, los nematodos fitopatógenos (NFs) son uno de los patógenos más frecuentes y nocivos para este tipo de cultivos, provocando grandes pérdidas económicas a nivel internacional. Existen diferentes métodos de control para este tipo de patógenos, siendo el control químico el más utilizado y efectivo en el corto plazo; sin embargo, su uso excesivo produce un efecto negativo para el medioambiente, la salud de las personas y la sostenibilidad de los sistemas productivos. En este contexto, el uso de depredadores naturales de NFs, como los hongos nematófagos (HNs), surge como alternativa sostenible. En la naturaleza, muchos de estos HNs actúan como endófitos, colonizando la planta hospedera y otorgándole beneficios como la estimulación del crecimiento y protección frente a patógenos, entre otros. Sin embargo, la efectividad de los formulados usados en terreno suele disminuir con el tiempo. Por otro lado, existen compuestos biodegradables y de baja toxicidad como el quitosano, un polímero derivado del procesamiento de desechos de la industria pesquera (Ej. caparazón de crustáceos), que puede aumentar el parasitismo de los HNs frente a NFs.

En el Laboratorio de Bioprocesos de Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Centro Regional Quilamapu, se han aislado distintas cepas nativas de HNs con potencial endófito, algunas de ellas masificadas para la formulación de

productos comerciales de uso agrícola. De esta manera, el objetivo de esta investigación fue identificar a nivel de especie cinco cepas nematófagas de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Metapochonia* y *Trichoderma* (una de cada género), determinar la colonización endófitica de estos hongos en tomate y evaluar el efecto del quitosano en el crecimiento fúngico y en la actividad parasitaria de las cepas contra “nematodos cebo”. Para este fin, se identificaron a nivel de especie mediante un análisis de secuencia *multi-locus* (MLSA), seguido de un ensayo de colonización endófitica en tomate y observando su crecimiento fúngico en presencia de quitosano *in vitro*. Se realizó un ensayo de parasitismo *in vitro* frente al nematodo cebo *Steinernema australe* en presencia de tres concentraciones distintas de quitosano ($7,5 \times 10^2$ ppm; $1,5 \times 10^3$ ppm y $2,25 \times 10^3$ ppm). Los resultados obtenidos indicaron que las cepas nematófagas estudiadas pertenecen a las especies *Beauveria peruviansis*, *Metarhizium brunneum*, *Paecilomyces carneus* y *Metapochonia rubescens*. La cepa de *Trichoderma* no pudo ser identificada a nivel de especie, por lo que se requiere del análisis de más regiones marcadoras para afirmarlo con certeza. *P. carneus*, *M. rubescens*, *Trichoderma* sp. presentaron capacidad de colonización endófitica en tomate, en contraste *B. peruviansis* y *M. brunneum* no presentaron colonización endofítica. En cuanto al crecimiento en quitosano, todas las especies mostraron tolerancia a las distintas concentraciones de quitosano aplicadas tras 15 días de incubación. De las cepas analizadas, *B. peruviansis* y *Trichoderma* sp. presentaron un aumento actividad nematófaga, la que se incrementó en presencia de $1,5 \times 10^3$ ppm y $2,25 \times 10^3$ ppm de quitosano en el caso de *Beauveria* y $2,25 \times 10^3$ ppm en *Trichoderma* sp., en comparación a los tratamientos en ausencia de este polímero.

Estos resultados mostraron que todas las cepas estudiadas son tolerantes a distintas concentraciones de quitosano y que éste incrementa la actividad parasitaria de *B. peruviansis* y *Trichoderma* sp. La presente Memoria de Título es el primer reporte sobre el efecto del quitosano en el parasitismo de hongos nematófagos endófitos nativos sobre el nematodo cebo *S. australe*, sobre la capacidad de colonización endofítica de las especies *P. carneus* y *M. rubescens*, y sobre la capacidad nematófaga de *B. peruviansis*.

6. SUMMARY

Effect of chitosan on the parasitic action of native strains of endophytic fungi against bait nematodes

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is of great relevance globally, due to its nutritional value and being a good source of antioxidants. It is one of the most cultivated vegetables in Chile and the world. However, its crops are susceptible to various diseases caused by phytopathogenic agents. Among these, plant-parasitic nematodes are one of the most frequent and harmful pathogens for this crop, causing great economic losses at the international level. There are different control methods for this type of pathogens, being chemical control the most used and effective in the short term, however, its excessive use leads to a negative effect on the environment, people's health, and the sustainability of production systems. In this context, the use of natural predators of plant-parasitic nematodes, such as nematophagous fungi, emerges as a sustainable alternative. In nature, many of these nematophagous fungi act as endophytes, colonizing the host plant and providing benefits such as growth stimulation, protection against pathogens, among others. However, the effectiveness of field formulations tends to diminish over time. On the other hand, there are biodegradable and low toxicity compounds such as chitosan, a polymer derived from the processing wastes from the fishing industry (e.g. crustacean shells), which can increase the parasitism of nematophagous fungi against plant-parasitic nematodes.

In the Bioprocess Laboratory of Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Quilamapu Regional Center, different native nematophagous strains of fungi with endophytic potential have been isolated, some of them massified for the formulation of commercial products for agricultural use. Thus, the objective of this research was to identify at the species level five strains of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Metapochonia* and *Trichoderma* (one of each genus) previously isolated as nematophagous, the endophytic colonization of the fungi on tomato, and the effect of chitosan on fungic growth and parasitic activity of the strains. For this purpose, they were identified to species level by *multi-locus* sequence analysis (MLSA), followed by an endophytic colonization assay on tomato and by observing their fungic growth in the presence of chitosan *in vitro*. An *in vitro* parasitism assay was performed against the "bait nematode" *Steinernema australe* in the presence of three different concentrations of chitosan (7.5×10^2 ppm; 1.5×10^3 ppm and 2.25×10^3 ppm).

The results obtained indicated that these belong to the species *Beauveria peruviansis*, *Metarhizium brunneum*, *Paecilomyces carneus* and *Metapochonia rubescens*. The *Trichoderma* strain could not be identified to species level, so further analysis of marker regions is required to state it with certainty. *Paecilomyces carneus*, *M. rubescens*, *Trichoderma* sp. presented endophytic colonization capacity in tomato, in contrast *B. peruviansis* and *M. brunneum* did not present endophytic colonization. Regarding growth in chitosan, all species showed tolerance to the different concentrations of chitosan applied during 15 incubation days. Of the strains tested, *B. peruviansis* and *Trichoderma* sp. showed an augmentation in the

nematophagous activity, which increased in the presence of 1.5×10^3 ppm and 2.25×10^3 ppm of chitosan in the case of the former and 2.25×10^3 ppm in the latter, compared to treatments in the absence of this polymer.

These results showed that all the strains studied are tolerant to different concentrations of chitosan and that chitosan increases the parasitic activity of *B. peruviansis* and *Trichoderma* sp. The present thesis is the first report on the effect of chitosan on the parasitism of native nematophagous endophytic fungi on the bait nematode *S. australe*, on the endophytic colonization capacity of *P. carneus* and *M. rubescens* species, and on the nematophagous capacity of *B. peruviansis*.

7. INTRODUCCIÓN

7.1 El tomate (*Solanum lycopersicum*)

El tomate es una de las hortalizas más cultivadas en el mundo, alcanzando alrededor de 187 millones de toneladas de producción y 5 millones de hectáreas de cosecha en 2020 a nivel mundial (FAOSTAT, 2020; ODEPA, 2021). Chile se encuentra en el lugar número 21 entre los mayores productores de tomate del mundo con 13 mil hectáreas de cultivo aproximadamente, siendo el segundo principal productor del hemisferio sur después de Brasil (ODEPA, 2021).

Dentro del aporte alimenticio que entrega esta hortaliza se encuentra su alto contenido de antioxidantes como licopeno y la vitamina C, además de aportar minerales como potasio, hierro y fósforo (Di Mascio *et al.*, 1989). Por otro lado, el tomate es utilizado en investigación como especie modelo para estudios evolutivos, de desarrollo y metabolismo vegetal (Seid *et al.*, 2015).

Durante su ciclo de cultivo y post-cosecha, el tomate es susceptible a más de 200 enfermedades causadas por patógenos, incluyendo hongos, bacterias, virus y nematodos (Singh *et al.*, 2017). Dentro de éstos, los nematodos fitopatógenos (NFs) son uno de los más dañinos y frecuentes en cultivos (Singh *et al.*, 2017).

7.2 Nematodos fitopatógenos

Los NFs son organismos pluricelulares, generalmente microscópicos, parásitos de plantas, que se encuentran en gran abundancia en los agroecosistemas y son una constante amenaza para la producción y calidad de los cultivos tanto en Chile como en el resto del mundo (Singh *et al.*, 2015; Bustos *et al.*, 2019). Entre los principales

daños ocasionados por NFs a la planta se encuentra el daño radicular, alterando la absorción de nutrientes y agua, y la síntesis de fitohormonas en las raíces, teniendo como efecto la disminución de productividad y crecimiento de la planta (Melakeberhan *et al.*, 2004; Abad *et al.*, 2009). Además, estos nematodos no solo dañan directamente al hospedero, sino que a causa del daño mecánico que producen puede ocurrir el ingreso de agentes infecciosos como bacterias y hongos (Ashraf & Khan, 2010).

Una de las razones que dificulta el control de los NFs es que el daño causado por estos organismos suele confundirse con el que producen ciertos tipos de hongos, el estrés hídrico u otras fitopatologías, y que en el momento en que se expresan los signos de enfermedad, las pérdidas del cultivo ya han ocurrido (Armendáriz *et al.*, 2015). Se estima que la pérdida por efecto de NFs es de 12,6%, equivalente a 157 mil millones de dólares a nivel mundial (Singh *et al.*, 2015).

Se han identificado más de 4.100 especies de NFs y se pueden clasificar de acuerdo con su relación espacial y hábito parasítico respecto a la raíz del hospedero en: ectoparásitos migratorios (Ej. *Xiphinema* spp.), ectoparásitos sedentarios (Ej. *Tylenchulus semipenetrans*), ecto-endoparásitos migratorios (Ej. *Helicotylenchus multicinctus*), endoparásitos migratorios (Ej. *Pratylenchus* spp.) y endoparásitos sedentarios (Ej. *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp. y *Globodera* spp.) (Palomares-Rius *et al.*, 2017). En este último grupo destaca el género *Meloidogyne*, el cual es el más nocivo en tomates y el más extendido a nivel global (Jones *et al.*, 2013).

Existen diversas herramientas para el control de NFs, como el uso de **métodos físicos** donde se encuentran la solarización, inundación y biofumigación (Brown *et*

al., 1997; Armendáriz *et al.*, 2015). Otra forma de control de NFs son las **prácticas culturales**, dentro de éstas está la rotación de cultivos con plantas no hospederas para la plaga objetivo, una de las técnicas más antigua para el control de plagas (Kratochvil *et al.*, 2004).

Por otro lado, uno de los métodos más usados es el químico, como por ejemplo el uso de **nematicidas químicos** (organoclorados, organofosforados, organobromados, carbamatos, entre otros) (Kim *et al.*, 2017). Internacionalmente, ha aumentado la restricción de su aplicación en la agricultura, debido a que su uso excesivo conlleva al daño en la salud de los aplicadores del producto, contaminación de los alimentos expuestos al pesticida, del medio ambiente por su acumulación en suelo y la diseminación al resto del ecosistema (Kim *et al.*, 2017).

Se estima que anualmente ocurren 385 millones de casos de intoxicaciones agudas asociadas a pesticidas, con 11.000 casos fatales, a nivel mundial (Boedeker *et al.*, 2020). Sumado a lo anterior, su uso crónico e indiscriminado ha tenido como consecuencia el desarrollo de resistencia por parte de las plagas, disminuyendo su efectividad, por esto el uso de pesticidas es solo una solución a corto plazo (Mahmood *et al.*, 2016). Esto ha provocado que plaguicidas usados masivamente para el control de nematodos, como el bromuro de metilo, hayan sido prohibidos internacionalmente (Bulathsinghala & Shaw, 2014). Dado lo anterior, actualmente existe un interés y tendencia al desarrollo de alternativas sustentables para el control de NFs.

El **control biológico** es un método que se basa en el uso de depredadores naturales de la plaga objetivo, ya sean insectos, bacterias, hongos o incluso virus.

El organismo suprime al patógeno objetivo, reduciendo su densidad poblacional y/o el daño generado por la plaga en el cultivo. Esto puede ocurrir de forma natural o por intervención del humano (introducción de agente externo, modificación del ambiente, etc.) (Hajek *et al.*, 2018; Poveda *et al.*, 2020). Respecto al control biológico de nematodos, los hongos nematófagos (HNs) son los más diversos y usan un serie de mecanismos de ataque que, a diferencia de los virus o bacteria, no necesitan estrictamente ser ingeridos para infectar y matar al nematodo (Jyoti & Singh, 2017; Peiris *et al.*, 2020). Por tales motivos, actualmente existe un interés y tendencia al desarrollo de alternativas sustentable para el control de NFs (Schouten, 2016).

7.3 Hongos nematófagos

Los HNs son depredadores naturales de los nematodos. Se han reportado más de 700 especies fúngicas nematófagas, pertenecientes a diversos tipos de divisiones taxonómicas (Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota) (Li *et al.*, 2015). Estos hongos pueden agruparse según su mecanismo de acción por el cual depredan a los nematodos. Dentro de los principales grupos se encuentran los depredadores/atrapadores de nematodos, endoparásitos, parásitos de huevos y los productores de toxinas (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2018).

7.4 Hongos endófitos

Se ha comprobado que los HNs pueden actuar como hongos endófitos (HEs) (Larriba *et al.*, 2015; Schouten *et al.*, 2016). Los endófitos se encuentran naturalmente en casi todos los hábitats y se comportan como mutualistas facultativos o de protooperación al colonizar el interior de la planta (Rodríguez *et*

al., 2009). Los HEs pueden cumplir diferentes roles en la planta, como estimular su crecimiento, otorgar tolerancia al estrés e incluso la producción de distintos metabolitos secundarios que le entregan defensas contra diferentes depredadores (Rodríguez *et al.*, 2009; Barra-Bucarei *et al.*, 2020).

7.5 Géneros de hongos endófitos nematófagos

Existen más de 20 géneros de hongos endófitos nematófagos, entre los cuales destacan: *Metapochonia*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Metarhizium* y *Beauveria*.

Metapochonia

Metapochonia es un género ubicuo descrito recientemente para clasificar especies del género *Pochonia* que forman clados separados de la especie única *Pochonia chlamydiospora* (Kepler *et al.*, 2013). *Metapochonia* pertenece a la familia Clavicipitaceae (Kepler *et al.*, 2013), se encuentra dentro del grupo de parásitos de huevos, aunque también puede parasitar estadios móviles, mostrando ser un agente de biocontrol efectivo contra especies de *Meloidogyne*, como por ejemplo *M. javanica* (Dalle-Mole-Giaretta *et al.*, 2012). Especies como *M. suchlasporia* y *M. rubescens* pueden también parasitar a los nematodos del quiste *Heterodera* spp. y *Globodera* spp. (Dackman *et al.*, 1985; López-Llorca & Robertson, 1992).

Este HN tiene capacidad endofítica, pudiendo colonizar la corteza y tejido vascular de plantas (Escudero *et al.*, 2012), causando distintos beneficios como aumentar el número y peso de las raíces, además de reducir el tiempo de floración en plantas de tomate (Zavala-Gonzales *et al.*, 2015; Larriba *et al.*, 2015).

Paecilomyces

Es un género cosmopolita de la familia *Clavicipitaceae* (Senthilkumar *et al.*, 2020). Las especies de este género pertenecen al grupo de los hongos parásitos de huevos y hembras de nematodos. Por lo general, coloniza y se nutre desde las estructuras reproductivas de *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. y *Heterodera* spp. en las etapas sedentarias del ciclo de vida. A pesar de esto, es capaz de infectar nematodos en sus etapas móviles (Senthilkumar *et al.*, 2020). Tiene la capacidad de colonizar y estimular el crecimiento en tomate (Yu *et al.*, 2015). También hay reportes de que especies como *P. variotii* promueve el crecimiento y germinación en semillas de tomate y ají (*Capsicum* spp.) mediante la producción de sideróforos y ácido indol acético (Moreno *et al.*, 2020).

Trichoderma

Este género está presente en la mayoría de los hábitats y pertenece a la familia Hypocreaceae (Kwak, 2021). Es un hongo conocido y utilizado por su capacidad de micoparasitismo contra distintos hongos fitopatógenos (Qualhato *et al.*, 2013). No obstante, *Trichoderma* también ha sido descrito como un hongo nematófago, actuando como parásito de huevos y productor de toxinas, controlando diferentes estadios del nematodo *Meloidogyne* (Medeiros *et al.*, 2017). Varias especies del género *Trichoderma* han sido reportadas como biocontroladoras de dicho nematodo (Al-Hazmi *et al.*, 2016; Medeiros *et al.*, 2017). Hay antecedentes de que *Trichoderma* es un HE capaz de promover el crecimiento de tallo y raíces en tomate (Tucci *et al.*, 2011; Medeiros *et al.*, 2017).

Metarhizium* y *Beauveria

Por otro parte *Metarhizium* y *Beauveria* son los géneros más utilizados para el biocontrol de insectos y se encuentran distintas zonas geográficas (Vega *et al.*, 2008; Jaronski *et al.*, 2010). Estos hongos también han mostrado ser efectivos contra nematodos, comparándose a la acción nematicida de *Paecilomyces* spp. (Youseff *et al.*, 2020).

Metarhizium es un hongo perteneciente a la familia Clavicipitaceae, al igual que *Metapochonia* y *Paecilomyces* (Sung *et al.*, 200; Kepler *et al.*, 2013). Este hongo tiene la habilidad de controlar nematodos tanto juveniles como en huevos y producir toxinas, atacando géneros como *Heterodera*, *Meloidogyne* y *Rotelynchulus* (Ghayedi *et al.*, 2013; Sorribas *et al.*, 2018; Youseff *et al.*, 2020). Éste ha mostrado ser un HE y promover el crecimiento de tallo y raíces en plantas de tomate (Krell *et al.*, 2018).

Beauveria es un hongo de la familia Cordycipitaceae (Rehner *et al.*, 2011). Se ha observado que puede actuar como parásito de huevos y juveniles, además de producir toxinas, controlando poblaciones de especies de nematodos agalladores como *M. hapla*, reduciendo la formación de agallas y masas de huevo en tomate (Liu *et al.*, 2008). *Beauveria* es un HE que puede colonizar diversas especies de vegetales como el tomate, poroto (*Phaseolus vulgaris*), algodón (*Gossypium hirsutum*), maíz (*Zea mays*), calabaza (*Cucurbita maxima*) y trigo (*Triticum aestivum*), entre otros (Gurulingappa *et al.*, 2010). Así mismo, en Chile se han aislado cepas nativas del género con capacidad de colonización endófitas en tomate y ají (Barra-Bucarei *et al.*, 2019; Barra-Bucarei *et al.*, 2020).

7.6 Quitosano como estimulante del parasitismo de hongos nematófagos sobre nematodos fitopatógenos

A pesar de todos los beneficios que los HNs otorgan a la planta hospedera frente a estos NFs, se ha reportado que la presencia de estos hongos puede decrecer con el tiempo y comprometer su acción de parasitismo sobre NFs, requiriéndose múltiples aplicaciones de HNs en cultivos (Maciá-Vicente *et al.*, 2009; Escudero & Lopez-Llorca, 2012; Escudero *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2012; Sorribas *et al.*, 2003). Por otro lado, la eficacia de HNs para reducir el número de NFs (Ej. *Meloidogyne*) y el daño en cultivos, tiende a ser menor al compararse con el uso de pesticidas y enmiendas orgánicas (Peiris *et al.*, 2020).

En la búsqueda de aumentar el parasitismo HNs sobre NFs, se ha demostrado que compuestos como el quitosano tienen la capacidad de inducir e incrementar dicha acción en HNs (Palma-Guerrero *et al.*, 2008; Escudero *et al.*, 2016; Ahmed & Omara, 2018). El quitosano es un biopolímero constituido por monómeros de β -1,4-glucosamina. Es seguro y de baja toxicidad en humanos (Kean & Thanou, 2010), se deriva de la desacetilación de la quitina, es el segundo polímero más abundante encontrado en la naturaleza después de la celulosa. Se extrae mayoritariamente de desechos pesqueros (Ej. caparazón de crustáceos), obteniéndose mediante desmineralización, desproteinización y desacetilación de éstos (Tokatlı & Demirdöven, 2018).

El quitosano ha demostrado que puede potenciar el crecimiento y floración en tomates, actuar como estimulante del sistema inmune y reducir el daño causado por nematodos (El Hadrami *et al.*, 2010; Asif *et al.*, 2017). Si bien el quitosano posee

actividad antimicrobiana, se han reportado que algunos HNs y entomopatógenos son capaces de crecer en presencia de quitosano (Palma-Guerrero *et al.*, 2008). Este biopolímero puede incrementar la acción parasitaria de hongos de este tipo, como *P. chlamydosporia* y *T. harzianum* frente a huevos de nematodos agalladores mediante la inducción de la acumulación de proteasas en el apresorio del hongo utilizadas en el proceso de parasitismo (Palma-Guerrero *et al.*, 2008; Escudero *et al.*, 2016; Ahmed & Omara, 2018). Inclusive, se ha reportado que al combinar la aplicación de quitosano junto con HNs como *P. chlamydosporia*, se genera un aumento en la colonización endófitica en tomate y reduce el daño generado por *Meloidogyne* en la planta (Escudero *et al.*, 2017). La acción del quitosano en conjunto con HNs se resume a continuación en el esquema de la **Figura 1**.

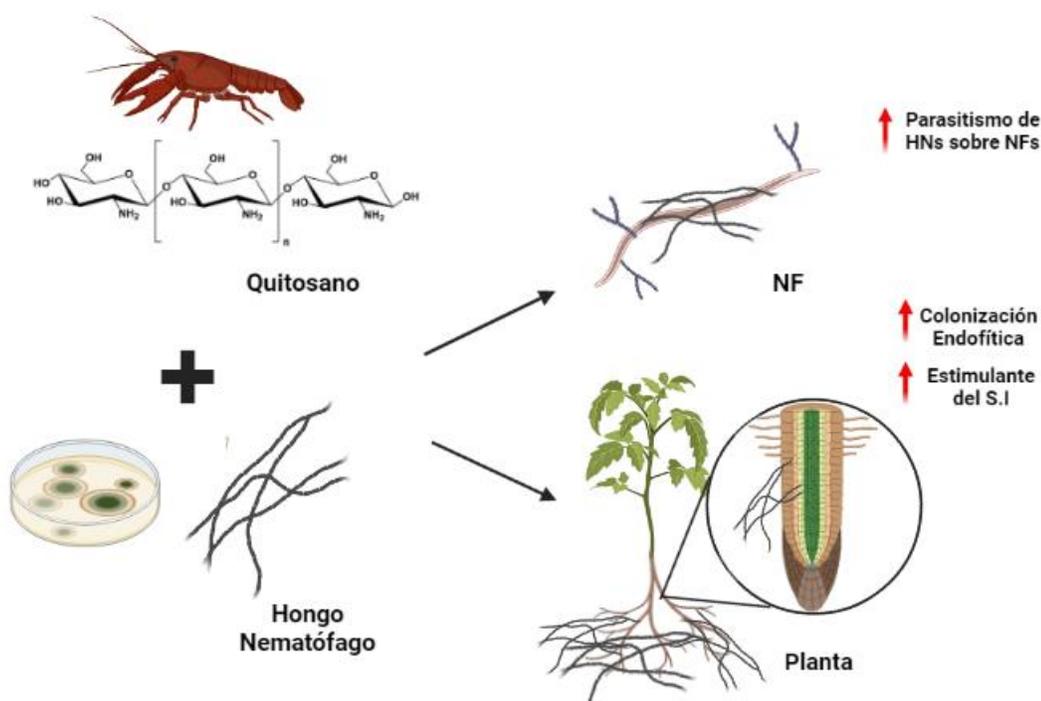


Figura 1. Acción del quitosano en conjunto con HNs. Este esquema resume el efecto que el quitosano ejerce en el parasitismo de NFs, potenciando la actividad nematófaga del hongo, y el efecto que ejerce sobre la planta, actuando como estimulante del sistema inmune y estimulando la colonización endofítica del HN.

Lo anterior, deja en evidencia la versatilidad de este biopolímero y que este podría favorecer e incluso mejorar la efectividad del biocontrol ejercido por ciertos HNs. Si bien se ha comprobado la acción que ejerce el quitosano en el parasitismo de algunas especies fúngicas, existen muchos géneros y especies en las que aún no ha sido probado. Dado lo anterior, esta investigación busca la identificación a nivel de especie de cinco cepas de hongos nativos de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Metapochonia* y *Trichoderma* aisladas como nematófagas, y la evaluación del efecto del quitosano sobre el crecimiento y la actividad parasitaria de las cepas en el nematodo *Steirneinema australe* como organismo modelo. Este nematodo se utilizó previamente como cebo para el aislamiento de dichas cepas. El Banco de Recursos Genéticos (BRGM) de INIA-Quilamapu, Chile, cuenta con una cría de esta especie, la que se emplea para este fin.

8. HIPÓTESIS

1. Cepas nativas de hongos pertenecientes a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Metapochonia* y *Trichoderma* tienen capacidad para colonizar de forma endofítica a tomate y potencial para parásitar al nematodo cebo *Sterneinema australe*.
2. La combinación de quitosano con cepas nematófagas de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Metapochonia* y *Trichoderma*, potencian la actividad parasítica de estas cepas sobre el nematodo cebo *Sterneinema australe*.

9. OBJETIVOS

9.1 Objetivo general

Determinar cepas de hongos de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Metapochonia* y *Trichoderma* corresponden a especies descritas como nematófagas, su colonización endofítica en tomate y el efecto del quitosano sobre su parasitismo frente al nematodo cebo *Sterneinema australe*.

9.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar a nivel de especie cinco cepas de hongos nematófagos nativos mediante técnicas moleculares.
- 2) Determinar la capacidad de colonización endofita de las cepas nativas de hongos nematófagos en *Solanum lycopersicum*.
- 3) Evaluar la habilidad de hongos nematófagos nativos de crecer en presencia de quitosano.
- 4) Determinar si el quitosano puede inducir el parasitismo de las cepas nativas de hongos nematófagos frente al nematodo cebo *Steinernema australe*.

10. MATERIALES Y METODOLOGÍAS

10.1 Materiales y reactivos

A continuación, se señalan los proveedores y los insumos adquiridos a partir de cada uno de ellos para el desarrollo de esta Memoria.

De **abm (USA)** se obtuvo: Tinción de ADN SafeView™.

De **Adama (Chile)** se obtuvo: Quitosano marca BioMovens®.

De **Dilaco (Chile)** se obtuvo: Placas de Petri de 90 mm x 15 mm y 60 mm x 15 mm, discos de papel filtro estériles 6 mm.

De **Ergo (Chile)** Se obtuvo: Semillas de Tomate Cal Ace

De **Merk (USA)** se obtuvo: Medio de cultivo ADP, medio de cultivo agar noble, cloranfenicol, TAE 50x, Tween 20.

De **Nippon Genetics (USA)** se obtuvo: Estándar de peso molecular de 1 kb FastGene.

De **Promega (USA)** se obtuvo: Sistema comercial de extracción *Wizard genomic DNA purification kit* y *Green Master Mix*.

De **Sigma Chemical Co. (MO, USA)** se obtuvo: cloranfenicol.

10.2 Microorganismos

Los microorganismos utilizados en esta investigación pertenecen a la Colección Chilena de Recursos Genéticos Micorbianos (CChRGM). Las cepas de hongos nematófagos se mantienen criopreservados a -196°C en el BRGM y los nematodos

fueron facilitados por el laboratorio de nematología de INIA-Quilamapu, mantenidos a 10°C (**Tabla 1**).

Tabla 1. Microorganismos utilizados en esta Memoria de Título.

Género	Tipo	Aislamiento	Cepa	Lugar de colecta
<i>Beaveria</i>	Hongo	RGM 644	BRGM	Icalma, Región de La Araucanía, Chile
<i>Metharizium</i>	Hongo	RGM 447	BRGM	Vallenar, Región de Atacama, Chile
<i>Paecilomyces</i>	Hongo	MAU 179	BRGM	Parral, Región del Maule, Chile
<i>Metapochonia</i>	Hongo	RGM 1600	BRGM	Loncoche, Región de La Araucanía, Chile
<i>Trichoderma</i>	Hongo	JFD1_61-2	BRGM	Robinson Crusoe, Región de Valparaíso, Chile
<i>Steinernema</i>	Nematodo	820	Lab. Nematología	Isla Magdalena, Chile

10.3 Identificación molecular de cepas fúngicas a nivel de especie

La identificación a nivel de especie de cada cepa se llevó a cabo mediante un análisis de secuencia *multi-locus* (MLSA). Dentro de las regiones amplificadas para el MLSA se encuentran: la región intergénica nuclear del locus B (Bloc), región intergénica del espaciador transcrito interno (ITS), el gen de la subunidad más grande (*rpb1*) de la ARN polimerasa II y el gen del factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1*), el gen de β -tubulina (*tub2*), el espaciador intergénico de proteína hipotética DUF895, el gen de la subunidad grande (*nrLSU*) y el de la subunidad pequeña (*nrSSU*) del ARN ribosomal nuclear (**Tabla 2**).

Tabla 2. Partidores utilizados para cada región génica e intergénica en análisis *multi-locus*.

Género	Regiones	Partidores	Secuencia 5'3' F	Secuencia 5'3' R	Referencias
<i>Beauveria</i>	ITS	ITS1/ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	TCCTCCGCTTATTAGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990
	Bloc	B5.1F/B3.1R	CGACCCGGCCAACACTTTGA	GTCTCCAGTACCACTACGCC	Rehner <i>et al.</i> , 2005
		B5.4F/B3.3R	CATTCGMGGCYTGTTCTTTGG	TTCCAGTACCACTACGCCGGC	Rehner <i>et al.</i> , 2005
	<i>rpb1</i>	RPB1-Af/VH6R	GARTGYCCDGGDCAYTTYGG	ATGACCCATCATRGAYTCCTTRTG	Rehner <i>et al.</i> , 2011
	<i>tef1</i>	tef983F/tef2218R	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	ATGACACCRACRGCACRGTGTG	Rehner and Buckley 2005
<i>Metarhizium</i>	ITS	ITS1/ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	TCCTCCGCTTATTAGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990
	DUF895	MzIGS3/3F/3R	TGGTRTAACCRGCGAGACA	CGGGGGAGCCGACTTGGATT	Kepler <i>et al.</i> , 2013
		MzIGS32F/3R	GTGGCTCCTGACCATGGTTGC	CGGGGGAGCCGACTTGGATT	Kepler <i>et al.</i> , 2013
		MzIGS3_1F/4R	CGTGGCTCCTGACCATGGTTGC	GCGGGGGAGCCGACTTGGGA	Kepler <i>et al.</i> , 2013
	<i>tub2</i>	bt2a/bt2b	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Hubka <i>et al.</i> , 2012
		T1/bt2b	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Nosratabadi <i>et al.</i> , 2018
	<i>tef1</i>	tef983F/tef2218R	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	ATGACACCRACRGCACRGTGTG	Rehner and Buckley 2005
		EF1T/EF2T	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	GGAAGTACCAGTGATCATGTT	O'Donnell <i>et al.</i> , 1998
<i>Paecilomyces</i>	ITS	ITS1/ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	TCCTCCGCTTATTAGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990
	nrLSU	LROR/LR5	ACCCGCTGAACTTAAGC	TCCTGAGGGAAACTTCG	Renher <i>et al.</i> , 1994 y 1995
	nrSSU	nrSSU-CoF/R	TCTCAAAGATTAAGCCATGC	TCACCAACGGAGACCTTG	Wang <i>et al.</i> , 2015
<i>Pochonia</i>	ITS	ITS1/ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	TCCTCCGCTTATTAGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990
	nrLSU	LROR/LR5	ACCCGCTGAACTTAAGC	TCCTGAGGGAAACTTCG	Renher <i>et al.</i> , 1994 y 1995
	<i>tef1</i>	EF728F/EF2	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	GGAAGTACCAGTGATCATGTT	Carbone and Khon, 1999
<i>Trichoderma</i>	<i>tef1</i>	EF728F/EF2	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	AACTTGCAAGCAATGTGG	Carbone and Khon, 1999

Extracción de ADN genómico y cuantificación

Se usaron cultivos de cada una de las cepas de hongos a partir de punta de hifa, crecidos en medio PDA durante 7 a 14 días a 25°C, seguidos de subcultivos en caldo dextrosa de papa en agitación constante (100-120 rpm) durante 5 a 6 días a 25°C. El análisis molecular de las muestras se llevo a cabo en el Laboratorio de

Biología Molecular del BRGM, utilizando de 30 a 60 mg de micelio obtenido a partir de cultivos en medio líquido, el cual fue secado en papel absorbente y almacenado en un tubo de Eppendorf de 2 mL a -80°C. La extracción de ADN genómico se realizó mediante el sistema comercial de extracción *Wizard genomic DNA purification kit* (Promega). Empleando el protocolo descrito para hongos como lo describe el fabricante. Una vez obtenido el ADN, se cuantificó su concentración y pureza en un espectrofotómetro de microplacas Epoch (Biotek). La concentración se determinó a través de los valores de absorbancia (A) obtenidos a una longitud de onda de 260 nm de acuerdo con la ley de Lambert-Beer: $A = \epsilon \cdot b \cdot C$. Donde A es la absorbancia de la disolución a una longitud de onda dada, ϵ es el coeficiente de extinción molar y C es la concentración de la disolución. La pureza se obtuvo mediante las relaciones de absorbancias $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ y $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ (Olson and Morrow, 2012). Completada la cuantificación los tubos se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Amplificación por PCR y secuenciación

Las reacciones de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en un volumen total de 26 μL , incluyendo 10,2 μL de H_2O , 0,8 μL de cada partidor a una concentración de 1 μM , 13 μL del reactivo Gotaq G2 Green Master Mix (Promega) y 2 μL de ADN de cada cepa fúngica, procurando cargar aproximadamente 100 ng/ μL por muestra. Los programas de cada reacción de PCR usados en este trabajo se encuentran en **Tabla 3**. Completadas las reacciones de PCR, se realizó una electroforesis a 80v por 60 minutos en geles de agarosa al 1% en TAE con el objetivo de corroborar la amplificación de cada muestra.

Posteriormente, se corroboró cada amplicón en un transiluminador y se almacenaron los amplicones a -20°C.

Tabla 3. Programas de amplificación por PCR usados para cada pareja de partidores..

Programas de amplificación por PCR			
Partidores	Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos
ITS5/ITS4	95	3 min	1
	95	30 sec	30
	55	30 sec	
	72	1 min	
	72	5 min	1
B5.1F/B3.1R	94	2 min	1
	94	30 sec	40
	56	30 sec	
	72	1 min	
	72	15 min	1
RPB1-Af/RPB1A_VH6R RPB1-Af/RPB1-Cr	94	4 min	1
	94	1 min	34
	56	1min	
	72	1,5 min	
	72	10 min	1
	15	18 hrs	1
tef983F/tef2218R EF728F/EF2	94	2 min	10
	66	1 min	36
	94	30 sec	
	56	30 sec	
	72	1 min	1
	72	10 min	1
LROR/LR5	94	2 min	1
	94	1 min	35
	54	1 min	
	72	2 min	
	72	15 min	1
nrSSU-CoF/nrSSU-CoR	95	4 min	1
	95	1 min	30
	54	1 min	
	72	2 min	
	72	8 min	1
MzIGS3_1F/MzIGS3_4R MzIGS3_2F/MzIGS3_3R MzLGS3_3F/MzIGS3_3R	95	2 min	1
	95	30 sec	40
	57	30 sec	
	72	1 min	
	72	15 min	1

Se secuenciaron ambas hebras de cada amplicón por la empresa Macrogen (Inc., Seoul, Corea del Sur) mediante el método de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el *software* Sequencher 5.4.6 (GenesCodes Corporation, MI, USA) para su edición y ensamblaje.

Análisis filogenético

Para la identificación taxonómica de las cepas a nivel de especie, se realizaron alineamientos múltiples de secuencias de las regiones Bloc, DUF985, *tub2*, ITS, *nrLSU*, *nrSSU*, *rpb1* y *tef1* frente a las secuencias obtenidas en la literatura (Inglis *et al.*, 2006; Khonsanit *et al.*, 2020; Kondo *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2021) y base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para el alineamiento de las secuencias se empleó la herramienta *Multiple Alignment Using Fast Fourier Transform* (MAFFT) (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato *et al.*, 2002). Luego se evaluaron y depuraron los alineamientos con la herramienta trimAl v1.2 (<http://phylemon2.bioinfo.cipf.es/utilities.html>) utilizando el método Automated1 (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2009). Como etapa siguiente, se concatenaron los alineamientos depurados con el *software* BioEdit para la obtención de un alineamiento consenso. Para la construcción de los árboles filogenéticos, los alineamientos de cada cepa fueron analizados con el método de máxima verosimilitud con la herramienta IQ-Tree (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>) (Nguyen *et al.*, 2015), utilizando un modelo de sustitución Auto, el método de *bootstrap* ultrarápido (UFboot) para un total de 1.000 iteraciones. Junto con el método bayesiano mediante CIPRES (<https://www.phylo.org/index.php>), empleando la

herramienta MrBayes (Miller *et al.*, 2010). Los árboles obtenidos fueron visualizados y editados con el *software* FigTree e Inkscape v1.1, respectivamente.

10.4 Ensayo de colonización endofítica y reaislamiento de hongos endófitos en tomate

Se desinfectaron semillas de tomate variedad Cal Ace (marca Ergo), por sumersión en una solución de etanol al 95 % durante 1 min, luego en hipoclorito de sodio al 1,5% durante 3 min y posteriormente en etanol al 95% por 1 min. Las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel absorbente estéril por una hora. A continuación, se prepararon tubos de ensayo con 40 mL de medio de cultivo agar dextrosa de papa (ADP) con cloranfenicol (Cm) (0,025 g/L). Se prepararon suspensiones de conidias de cada cepa hasta alcanzar una concentración de 1×10^7 conidias/mL. Para lo anterior, se extrajeron conidias desde cultivos axénicos de las cepas utilizando asas de inoculación, las que se depositaron en tubos con 5 mL de Tween 20 0,01% v/v en agua destilada y se homogenizaron. A continuación, se determinó la concentración de conidias de cada tubo mediante conteo en cámara de Neubauer usando 100 μ L de solución. Cada muestra se observó en un microscopio óptico usando el objetivo 40x. Los medios en los tubos fueron inoculados con un volumen de 150 μ L de suspensión de conidias, se utilizó cuatro tubos por cepa, incluyendo el control. Una vez inoculados, se incubaron en una cámara de crecimiento durante 7 días a 25°C, posteriormente se llenaron con sustrato estéril y se sembraron dos semillas desinfectadas por cada tubo, agregando 4 mL de agua estéril. Los tubos se incubaron por 30 días con un

fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad humedad relativa (HR) de 80% a 25°C. Se realizaron riegos con 3 mL de agua destilada estéril cada 3 días.

Al cumplirse el periodo de crecimiento de las plantas, se realizó la extracción y desinfección de éstas. Se sumergieron las estructuras (tallo, hojas y raíz) en placas estériles con etanol 70% por 15 s, luego en hipoclorito de sodio 1,5% durante 3 min y nuevamente en etanol 70% por 15 s, para luego enjuagar tres veces en agua destilada estéril (1 min cada uno). Finalizada la desinfección, se realizaron cortes de cada estructura con bisturí estéril, en el caso de las raíces y los tallos en trozos de 5 a 10 mm de largo y en el caso de las hojas en trozos de 5 mm de largo. Los trozos se distribuyeron en placas de Petri con medio de cultivo Agar Noble suplementado con cloranfenicol (0,025 g/L). Considerando diez trozos de cada estructura de la planta por placa, el material se incubó durante 45 días con un fotoperiodo de 12:12 hrs, HR de 80% a 25°C. Finalmente, se revisaron las placas cada 10 o 15 días usando una lupa estereoscópica para observar estructuras del HE creciendo desde el interior de cada tejido vegetal. Obteniendo como variable de salida el porcentaje de colonización endofítica de cada estructura (hoja, tallo y raíz), considerando 10 estructuras colonizadas por placa de Petri como el máximo porcentaje de colonización (100%) (Barra-Bucarei *et al.*, 2020).

10.5 Ensayo de crecimiento fúngico en presencia de quitosano

Se prepararon placas de Petri de 90 mm de diámetro con ADP suplementado con cloranfenicol (0,025 g/L). Luego, se prepararon tres concentraciones de quitosano BioMovens® (Adama): $7,5 \times 10^2$ ppm, $1,5 \times 10^3$ ppm y $2,25 \times 10^3$ ppm, en agua destilada estéril. Posteriormente, se suplementó las placas con 100 μ L de las

distintas concentraciones de quitosano mediante esparcimiento superficial. Se hicieron suspensiones de conidias de cada cepa fúngica usando el procedimiento descrito en el **punto 10.3**, hasta alcanzar una concentración de 1×10^6 conidias/mL. Se evaluaron cinco cepas con cinco repeticiones y un control con agua destilada estéril. Se depositaron discos de papel filtro estéril en el centro de cada placa de Petri que contenían 10 μ L de suspensión de conidias (1×10^6 conidias/mL) según la cepa correspondiente. Para cada cepa se realizaron cuatro tratamientos, que se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Tratamientos utilizados en ensayo de crecimiento fúngico en presencia de quitosano.

Tratamientos	Observaciones
T0: Control	Control negativo, Cepa fúngica en ADP (0 ppm de quitosano)
T1: QUI-7,5 x 10 ² ppm	Cepa fúngica en ADP suplementado con 7,5 x 10 ² ppm de quitosano
T2: QUI-1,5 x 10 ³ ppm	Cepa fúngica en ADP suplementado con 1,5 x 10 ³ ppm de quitosano
T3: QUI-2,25 x 10 ³ ppm	Cepa fúngica en ADP suplementado con 2,25 x 10 ³ ppm de quitosano

Las placas fueron mantenidas en una cámara de incubación a 25°C en oscuridad, se registró el radio de colonias los días 5, 7, 10, 13 y 15 post inoculación, excepto en el caso de la cepa de *Trichoderma* sp. JFD1_61-2, para la cual se midió los días 1, 2, 3, 4 y 5 debido a su rápido crecimiento en ADP. La variable de salida obtenida de cada experimento fue el crecimiento micelial determinado por el radio de la colonia (mm), el que fue medido con un pie de metro digital (cuatro repeticiones) los

cuales fueron promediados y analizados estadísticamente (adaptado de Laflamme *et al.*, 1999).

10.6 Evaluación de parasitismo fúngico *in vitro* sobre *Steinernema australe* en presencia de quitosano

Se prepararon placas de Petri de 60 mm de diámetro con agar noble suplementado con cloranfenicol (0,025 g/L). Luego, se prepararon soluciones de 2 concentraciones distintas de quitosano ($7,5 \times 10^2$ ppm, $1,5 \times 10^3$ ppm y $2,25 \times 10^3$ ppm), de la misma forma que en el **punto 10.4**. Posteriormente, se procedió al esparcimiento superficial de placas con 25 μ L de las distintas concentraciones de quitosano. Se hicieron suspensiones de conidias de 1×10^6 conidias/mL de cada cepa. Para ello, se extrajeron conidias de la misma manera que en el **punto 10.3**. Se evaluaron las cinco cepas con cinco repeticiones y un control con agua destilada estéril. Como cebo, se utilizaron nematodos *S. australe* cepa 820 en estadio Juvenil 2 (J2) facilitados por el Laboratorio de Nematología de INIA Quilamapu, incubados en larvas de *Galleria melonella*. Para el ensayo de parasitismo *in vitro* se usó una adaptación de la metodología descrita por DiLegge *et al.* (2019). Los nematodos se desinfectaron por sumersión en un vidrio reloj con hipoclorito de sodio (0,1%) por 15 s y tres lavados con agua no clorada estéril por un min cada uno. Posteriormente, se realizó conteo de la cantidad de nematodos en cámara de recuento McMaster, para luego depositar 25 μ L (30 nematodos promedio) sobre cada placa previamente suplementadas con quitosano y/o conidias (dependiendo del tratamiento) por esparcimiento superficial, incluyendo un control de desinfección de nematodos (nematodos en agar noble).

Luego, las placas fueron incubadas a 25°C en oscuridad durante 15 días en una cámara de crecimiento. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Los tratamientos se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Tratamientos utilizados en ensayo de parasitismo fúngico *in vitro* sobre *S. australe* en presencia de quitosano.

Tratamiento	Observaciones
T0: Nematodos + Cepa fúngica	Control negativo, 0 ppm de quitosano
T2: Nematodos + Cepa fúngica + Quitosano 7,5 x 10 ² ppm	Agar Noble suplementado con 7,5 x 10 ² ppm de Quitosano
T3: Nematodos + Cepa fúngica + Quitosano 1,5 x 10 ³ ppm	Agar Noble suplementado con 1,5 x 10 ³ ppm de Quitosano
T4: Nematodos + Cepa fúngica + Quitosano 2,25 x 10 ³ ppm	Agar Noble suplementado con 2,25 x 10 ³ ppm de Quitosano

Finalmente, se revisó cada placa los días 7 y 15 post inoculación. Contabilizando el número de nematodos parasitados de cada placa como variable de salida a analizar estadísticamente. Un nematodo parasitado se definió como aquel que presenta crecimiento y desarrollo de estructuras del hongo (hifas, conidióforos, etc.).

11. RESULTADOS

11.1 Identificación molecular de cepas fúngicas a nivel de especie

Los resultados obtenidos por análisis de secuencia *multi-locus* para las cepas de *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Paecilomyces* sp., *Metapochonia* sp. y *Trichoderma* sp. se muestran en las **Figuras 2, 3, 4, y 5** y la **Figura 6**, respectivamente. En el árbol filogenético de *Beauveria* sp. se observa que la cepa RGM 644 se ubica dentro del clado de cepas de referencia que pertenecen a la especie *Beauveria peruviansis*, con valores de soporte de *bootstrap* de 100% y 0,94 de probabilidad (**Figura 2**). En el árbol filogenético de *Metarhizium* sp., la cepa RGM 447 se encuentra en el clado de las cepas de referencia de la especie *Metarhizium brunneum*, con un soporte de *bootstrap* de 99% y 0,97 de probabilidad (**Figura 3**). El árbol resultante para *Paecilomyces* sp. muestra que la cepa MAU 179 se sitúa en el clado perteneciente a la especie *Paecilomyces carneus* con un soporte de *bootstrap* de 100% y un 0,97 de probabilidad (**Figura 4**). En el árbol de *Metapochonia* sp. se observa que el clado donde se ubica la cepa RGM 1600 incluye a las cepas de referencia de la especie *Metapochonia rubescens* con un 80% de *bootstrap* y un valor de probabilidad de 1 (**Figura 5**). El árbol resultante para *Trichoderma* sp. muestra que la cepa JFD1_61-2 está situada en el clado perteneciente a la especie *Trichoderma neocrassum* con un soporte de *bootstrap* del 95% y un valor 1 de probabilidad (**Figura 6**). Cabe mencionar que el árbol filogenético de esta cepa se construyó únicamente con la región *tef1*, por lo que no hay plena certeza da la especie, pero requiere el análisis de más regiones marcadoras para afirmarlo con certeza.

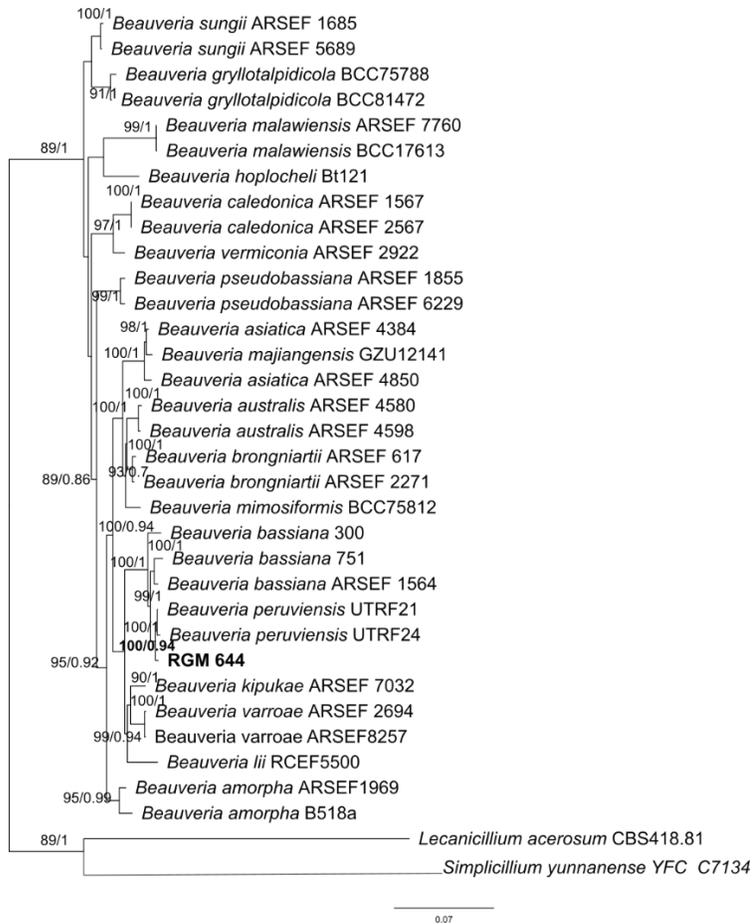


Figura 2. Árbol filogenético de *Beauveria*. Obtenido por análisis de secuencia *multi-locus* de las regiones intergénicas Bloc e ITS, y las regiones codificantes *rpb1* y *tef1* que muestra las relaciones taxonómicas de la cepa RGM 644 con *Beauveria*. Los datos ubicados en los nodos de las ramas representan el valor de soporte de *bootstrap* por el método UFBoot y el método bayesiano, respectivamente. Las especies *Lecanicillium acerosum* (CBS 418.81) y *Simplicillium yunnanense* (YFC C7134) fueron usadas como raíz del árbol. Los valores de *bootstrap* > 70 en UFBoot y > 0,03 en método bayesiano fueron omitidos.

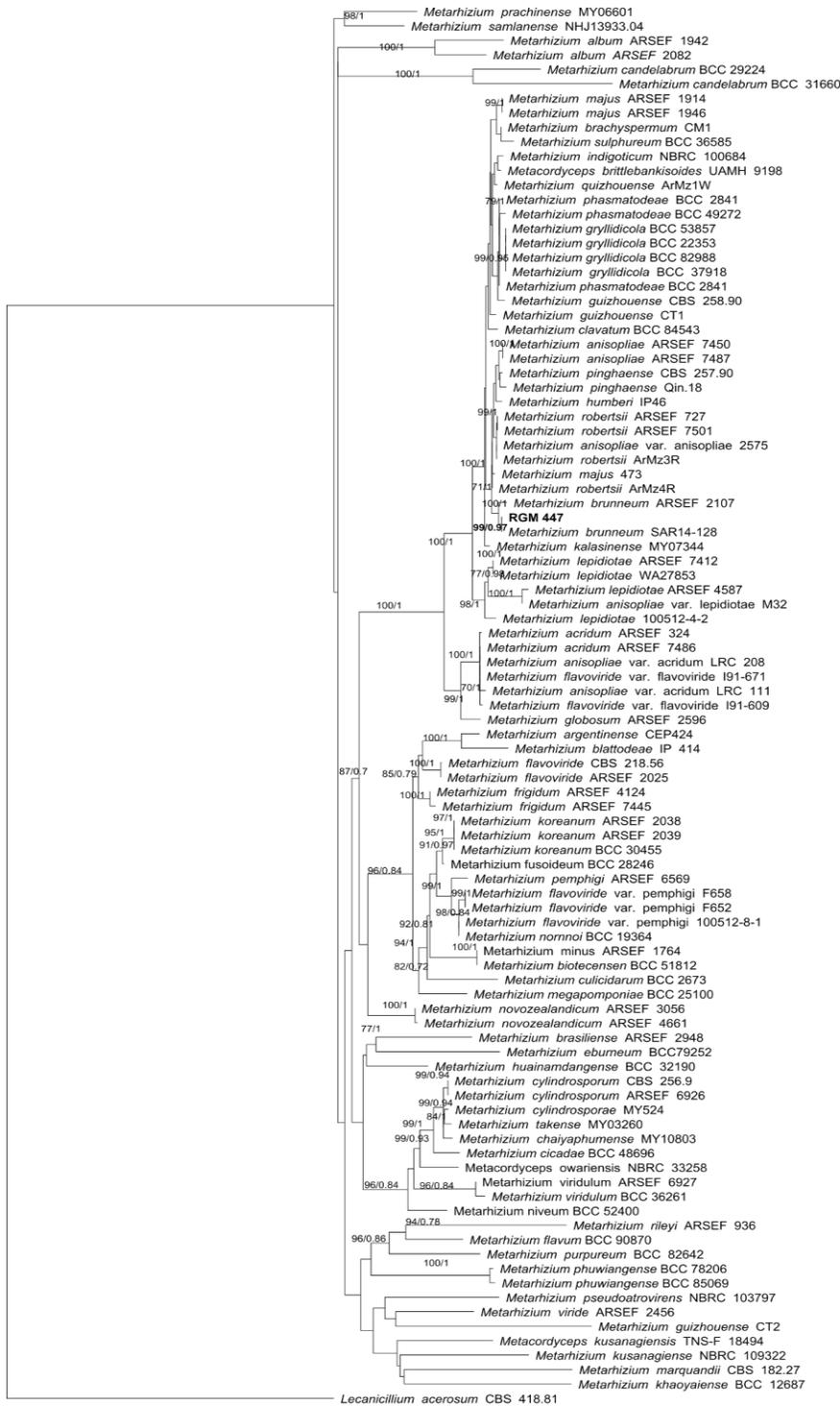


Figura 3. Árbol filogenético de *Metarhizium*. Obtenido por análisis de secuencia *multi-locus* de las regiones intergénicas DUF895 e ITS, y las regiones codificantes *tub2* y *tef1* que muestra las relaciones taxonómicas de la cepa RGM 447 con *Metarhizium*. Los datos ubicados en los nodos de las ramas representan el valor de soporte de *bootstrap* por el método UFBoot y el método bayesiano, respectivamente. La especie *Lecanicillium acerosum* (CBS 418.81) fue usada como raíz del árbol. Los valores de *bootstrap* > 70 en UFBoot y > 0,03 en método bayesiano fueron omitidos.

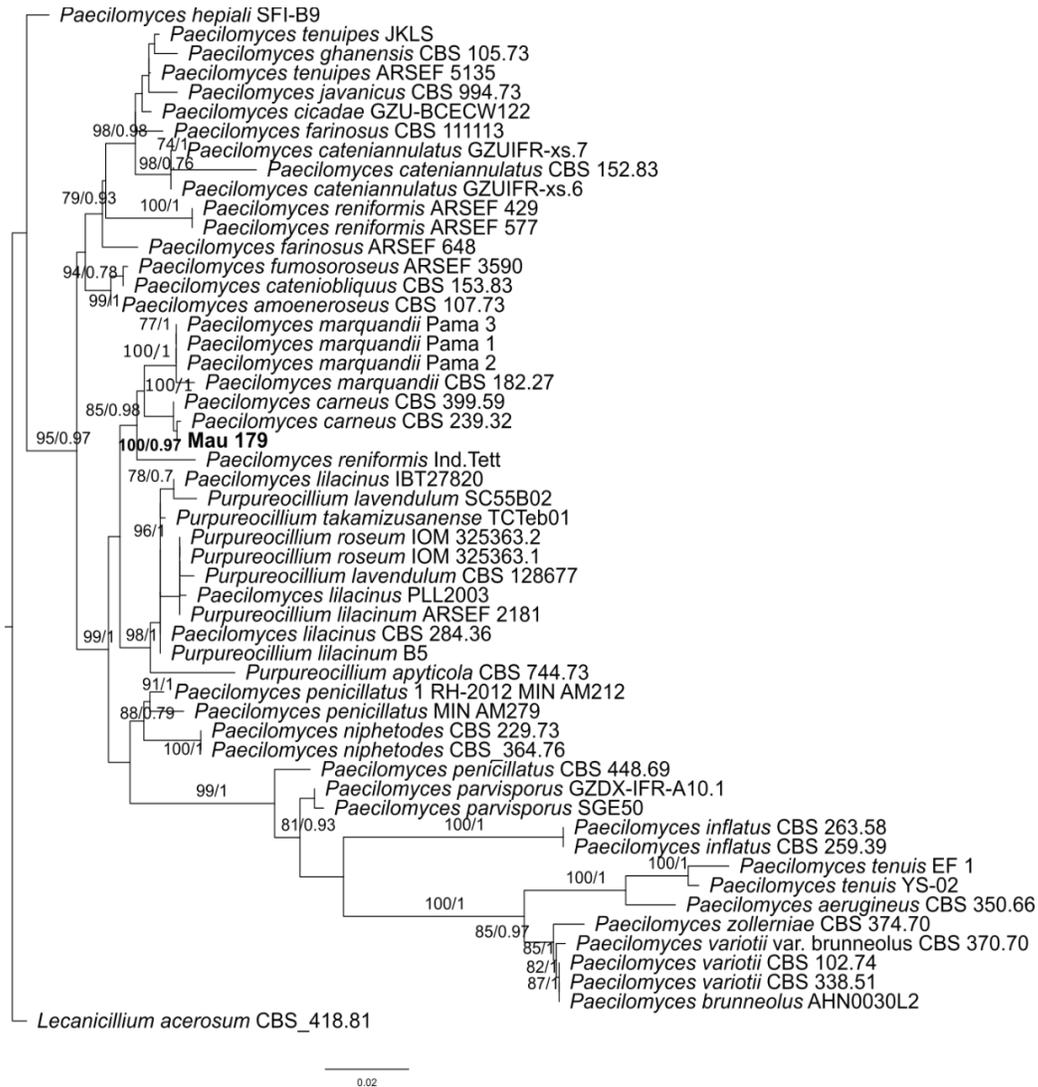


Figura 4. Árbol filogenético de *Paecilomyces*. Obtenido por análisis de secuencia *multi-locus* de la región intergénica ITS y las regiones codificantes nrLSU y nrSSU que muestra las relaciones taxonómicas de la cepa MAU 179 con *Paecilomyces*. Los datos ubicados en los nodos de las ramas representan el valor de soporte de *bootstrap* por el método UFBoot y el método bayesiano, respectivamente. La especie *Lecanicillium acerosum* (CBS 418.81) fue usada como raíz del árbol. Los valores de *bootstrap* > 70 en UFBoot y > 0,03 en método bayesiano fueron omitidos.

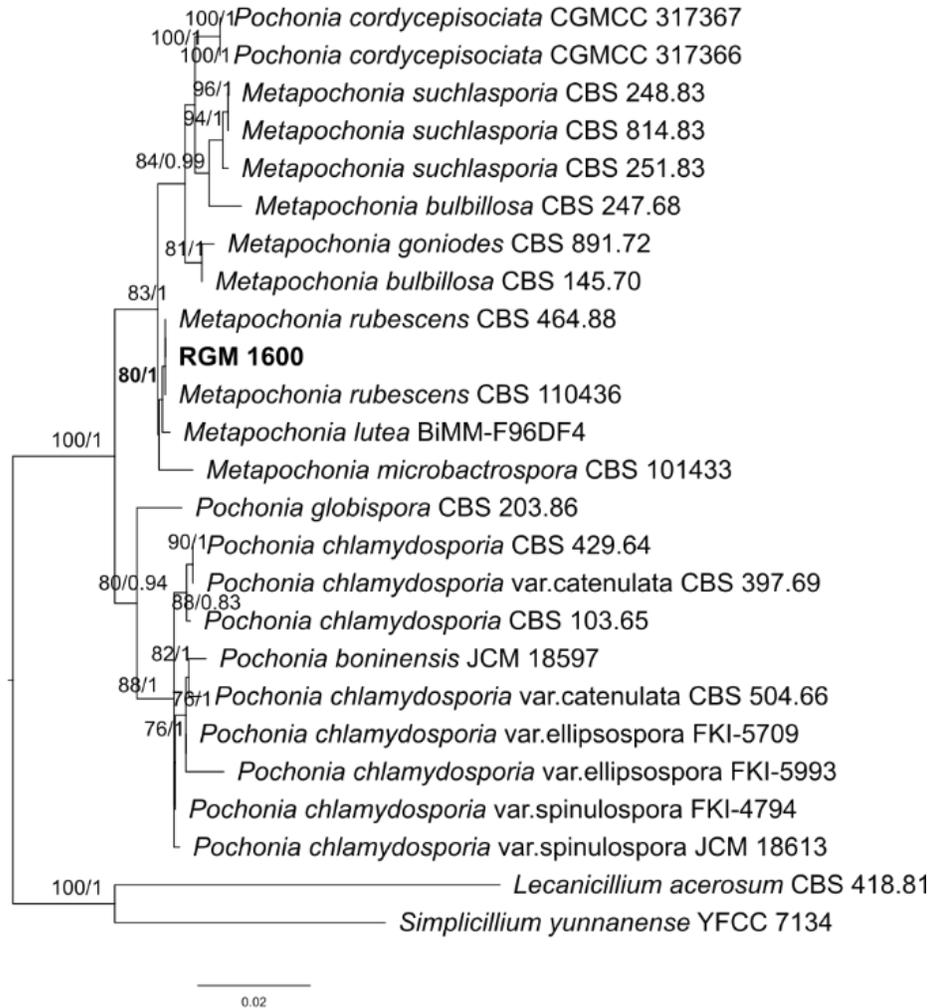


Figura 5. Árbol filogenético de *Metapochonia*. Obtenido por análisis de secuencia *multi-locus* de la región intergénica ITS y las regiones codificantes *nrLSU* y *tef1* que muestra las relaciones taxonómicas de la cepa RGM 1600 con *Pochonia*. y *Metapochonia* spp. Los datos ubicados en los nodos de las ramas representan el valor de soporte de *bootstrap* por el método UFBoot y el método bayesiano, respectivamente. Las especies *Lecanicillium acerosum* (CBS 418.81) y *Simplicillium yunnanense* (YFC C7134) fueron usadas como raíz del árbol. Los valores de *bootstrap* > 70 en UFBoot y > 0,03 en método bayesiano fueron omitidos.

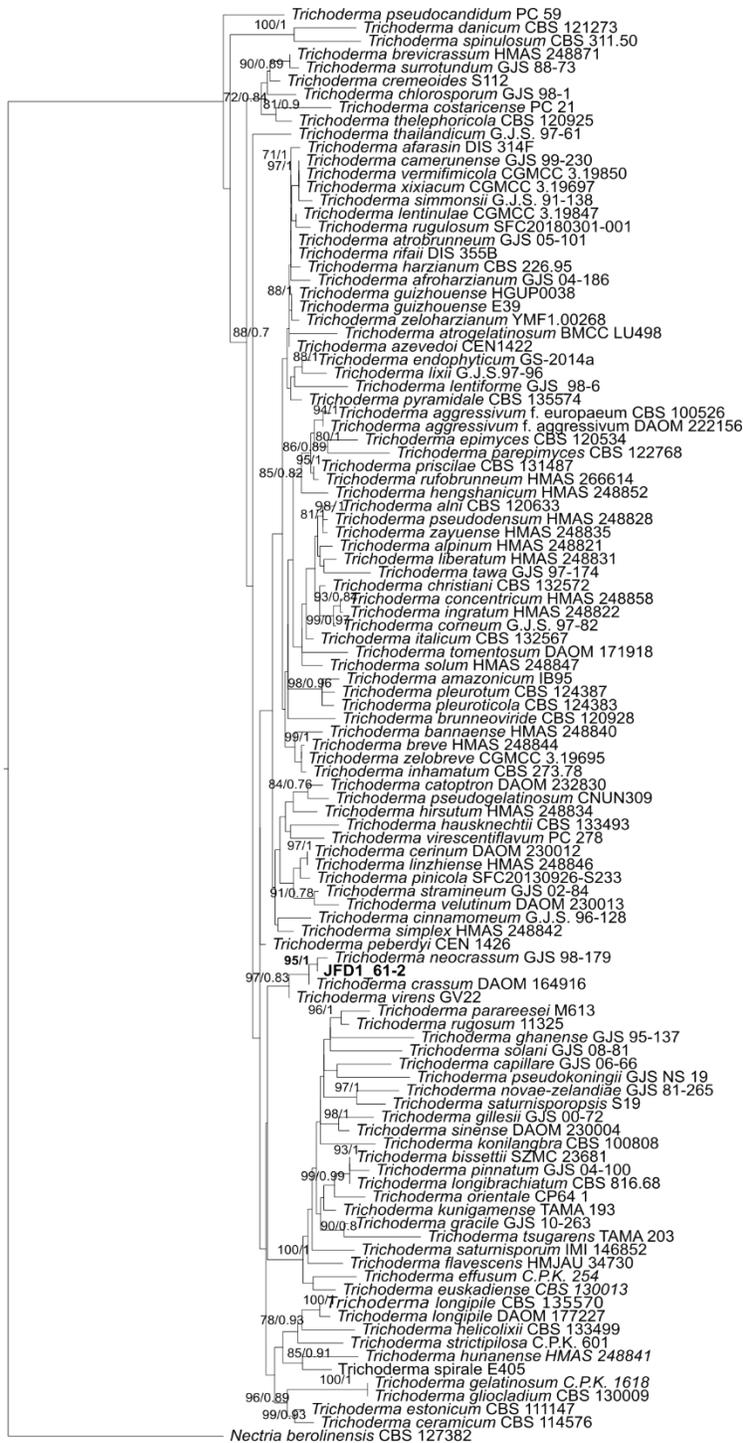


Figura 6. Árbol filogenético de *Trichoderma*. Obtenido por análisis de la región codificante *tef1* que muestra las relaciones taxonómicas de la cepa JFD1_61-2 con *Trichoderma*. Los datos ubicados en los nodos de las ramas representan el valor de soporte de *bootstrap* por el método UFBoot y el método bayesiano, respectivamente. La especie *Nectria berolinensis* (CBS 127382) fue usada como raíz del árbol. Los valores de *bootstrap* > 70 en UFBoot y > 0,03 en método bayesiano fueron omitidos.

11.2 Colonización endofítica de cepas nematófagas en tomate

La cepa *Trichoderma* JFD1_61-2 resultó ser endofítica de tomate únicamente en raíz (20% de colonización), lo que constituye un patrón de colonización localizado (**Figura 7**). Ni la cepa *M. brunneum* RGM 447 ni la cepa *B. peruviansis* RGM 644 presentaron colonización endofítica en ninguna de las estructuras de la planta de tomate. Por su parte, la cepa *M. rubescens* RGM 1600 resultó ser endofítica, colonizando todas las estructuras de la planta con un patrón de colonización sistémico. *M. rubescens* RGM 1600 presentó un mayor porcentaje de colonización en el tallo (72,5%) en comparación al obtenido en raíz (25,0%) y hojas (62,5%). La cepa *P. carneus* MAU 179 presentó colonización endofítica en cada una de las estructuras de la planta (colonización sistémica), mostrando un mayor porcentaje de colonización en el tallo (62,5%) en comparación al obtenido en raíz (17,5%) y hojas (47,5%). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las cepas RGM 1600 y MAU 179 en el porcentaje de colonización de las tres estructuras, tampoco en la colonización de raíz entre las cepas JFD1_61-2, RGM 1600 y MAU 179.

El porcentaje total de colonización de las cepas RGM 644, RGM 447, JFD1_61-2, RGM 1600 y MAU 179 fue de 0%; 0%; 6,7%; 53,3% y 42,5%, respectivamente. La colonización total por parte de las cepas RGM 1600 y MAU 179 mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto de las cepas RGM 447, JFD1_61-2 y el tratamiento control. RGM 1600 y MAU 179 no presentaron diferencias significativas entre sí ($p \geq 0,05$) (**Figura 7D**).

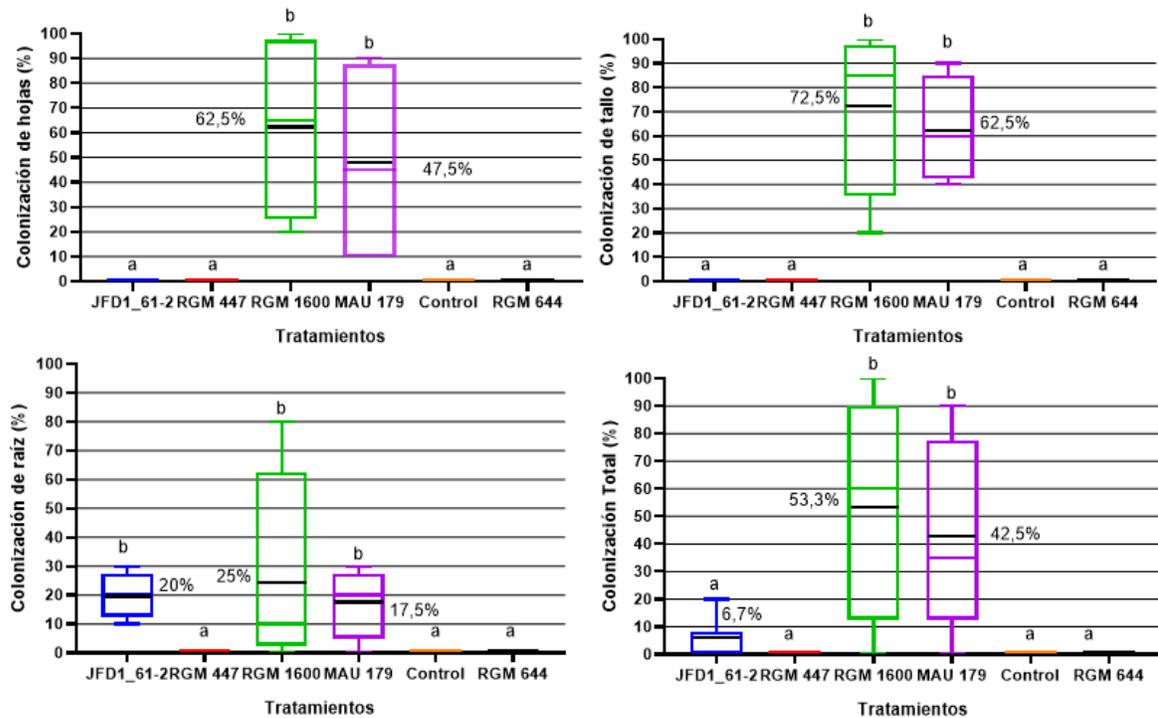


Figura 7. Porcentaje de colonización endofítica. Se visualiza el porcentaje de colonización endofítica de hojas (A), tallo (B) y raíz (C), y el de colonización total (D) para las cepas fúngicas JFD1_61-2, RGM 447, RGM 1600, MAU 179, RGM 644 y el control negativo. Tratamientos con una letra en común no son significativamente distintas ($p \geq 0,05$) de acuerdo con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

11.3 Efecto del quitosano en el crecimiento fúngico

Para la cepa *Trichoderma* sp. JFD1_61-2 se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) únicamente en el día 3 post inoculación, presentando una media de 27,39 mm de radio de colonia en el tratamiento con $2,25 \times 10^3$ ppm de quitosano, siendo significativamente menor respecto al control (29,08 mm). Sin embargo, a partir del cuarto día todas las colonias alcanzaron 35 mm de radio, cubriendo por completo la superficie de la placa de Petri (**Figura 8**).

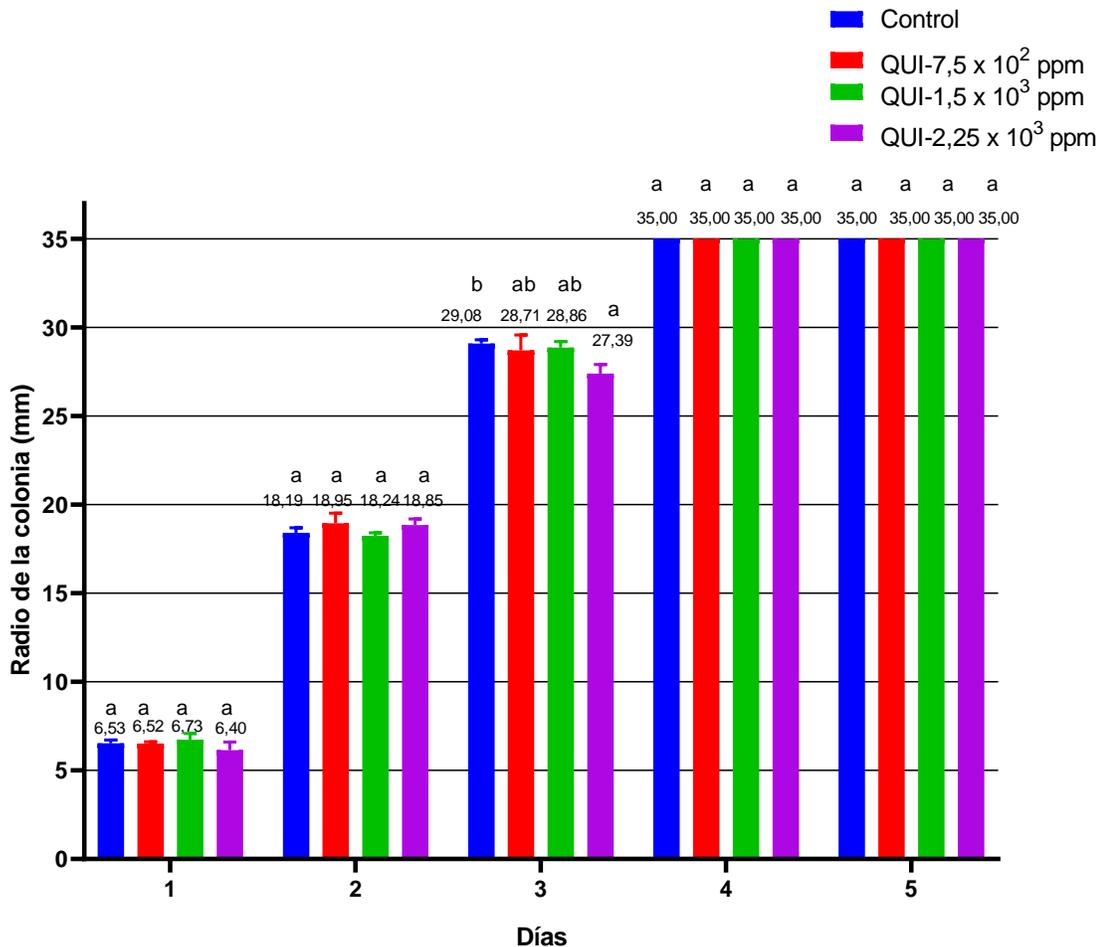


Figura 8. Crecimiento de *Trichoderma* sp. JDF1_61-2 sobre quitosano los días 1, 2, 3, 4 y 5 post inoculación. La gráfica presenta el radio de las colonias (mm) en los 5 días de medición para los cuatro tratamientos: Control, QUI-7,5 x 10² ppm, QUI-1,5 x 10³ ppm y QUI-2,25 x 10³ ppm. Los valores de la gráfica se obtuvieron de cuatro repeticiones por tratamiento. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó ANOVA de una vía y una prueba de comparación de medias LSD de Fisher. Medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p \geq 0,05$).

Para la cepa de *B. peruviansis* RGM 644 únicamente hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el tamaño de la colonia en el día 15 de incubación, en las concentraciones de 1,5 x 10³ ppm y 2,25 x 10³ ppm de quitosano respecto al control. Como se presenta en la **Figura 9**, para las concentraciones de 7,5 x 10² ppm y 1,5 x 10³ ppm de quitosano el radio de la colonia (30,75 mm) es menor respecto al

control (32,12 mm). Contrario a lo que ocurre a $2,25 \times 10^3$ ppm de quitosano, donde el radio de la colonia resultó ser significativamente mayor (33,63 mm) que en los otros tratamientos.

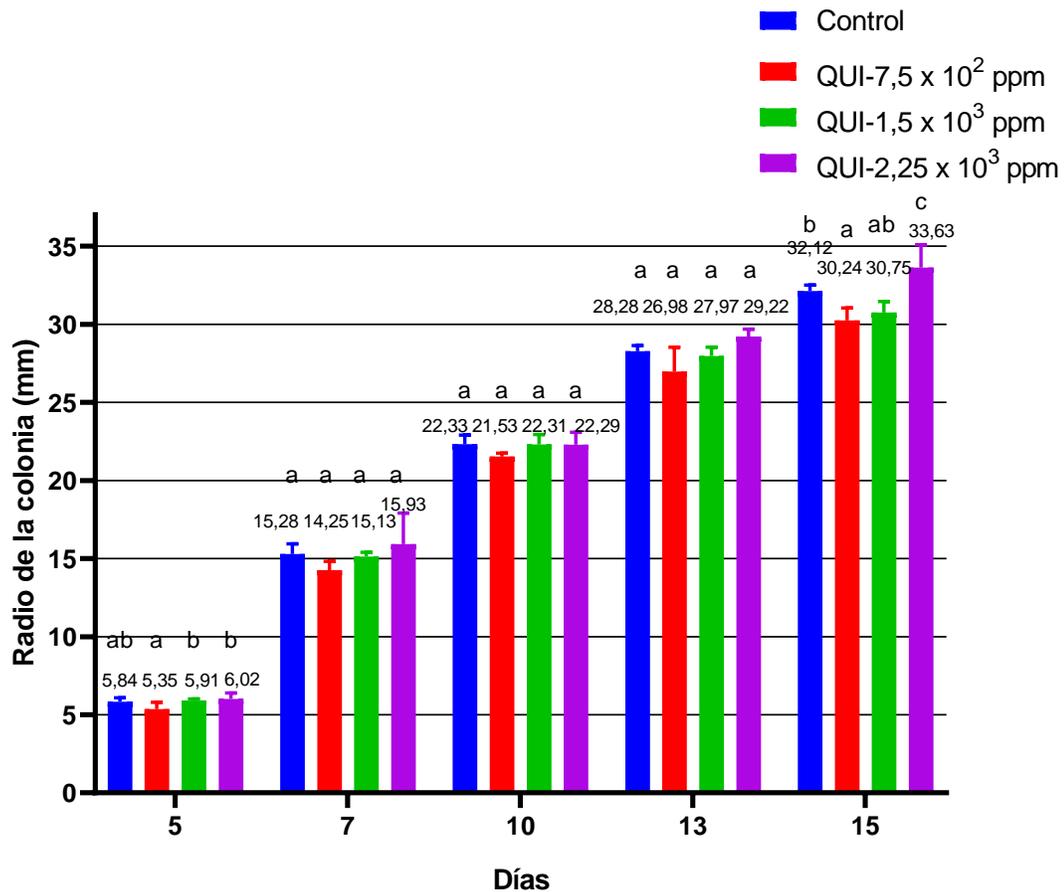


Figura 9. Crecimiento de *B. peruviansis* RGM 644 sobre quitosano los días 5, 7, 10, 13 y 15 post inoculación. La gráfica presenta el radio de las colonias (mm) en los 5 puntos de medición para los cuatro tratamientos: Control, QUI-7,5 x 10² ppm, QUI-1,5 x 10³ ppm y QUI-2,25 x 10³ ppm. Los valores de la gráfica se obtuvieron de cuatro repeticiones por tratamiento. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó ANOVA de una vía y una prueba de comparación LSD de Fisher. Medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p \geq 0,05$).

Respecto a la cepa de *M. rubescens* RGM 1600, para el día 13 de incubación el radio de la colonia en presencia de $2,25 \times 10^3$ ppm quitosano (24,12 mm) fue mayor

que el control (22,38 mm). Un comportamiento similar se observó en el día 15 de incubación, donde también se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la concentración $2,25 \times 10^3$ ppm de quitosano (27,41 mm) y el control (25,4 mm), como se observa en el **Figura 10**.

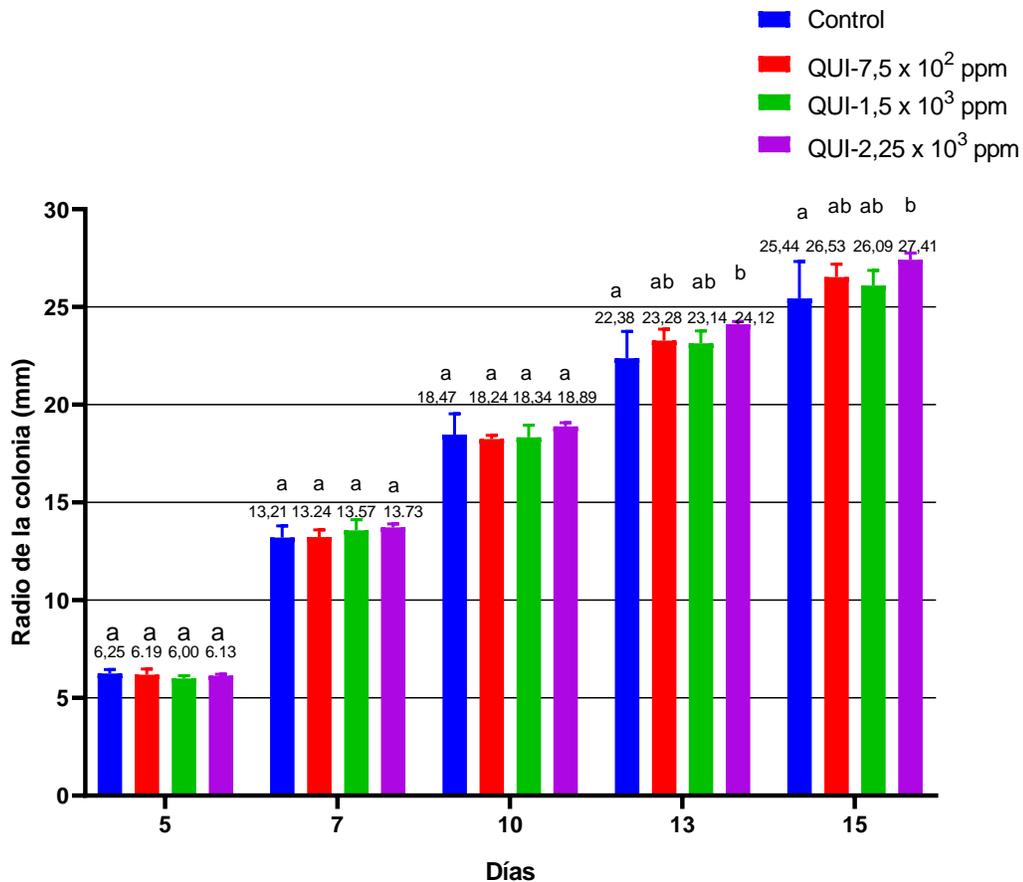


Figura 10. Crecimiento de *M. rubescens* RGM 1600 sobre quitosano los días 5, 7, 10, 13 y 15 post inoculación. La gráfica presenta el radio de las colonias (mm) en los 5 días de medición para los cuatro tratamientos: Control, QUI-7,5 x 10² ppm, QUI-1,5 x 10³ ppm y QUI-2,25 x 10³ ppm. Los valores de la gráfica se obtuvieron de cuatro repeticiones por tratamiento. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó ANOVA de una vía y una prueba de comparación LSD de Fisher, excepto para los días 7 y 10 donde se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p \geq 0,05$).

La cepa *P. carneus* MAU 179 no mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos, para ninguno de los puntos medidos (**Figura 11**).

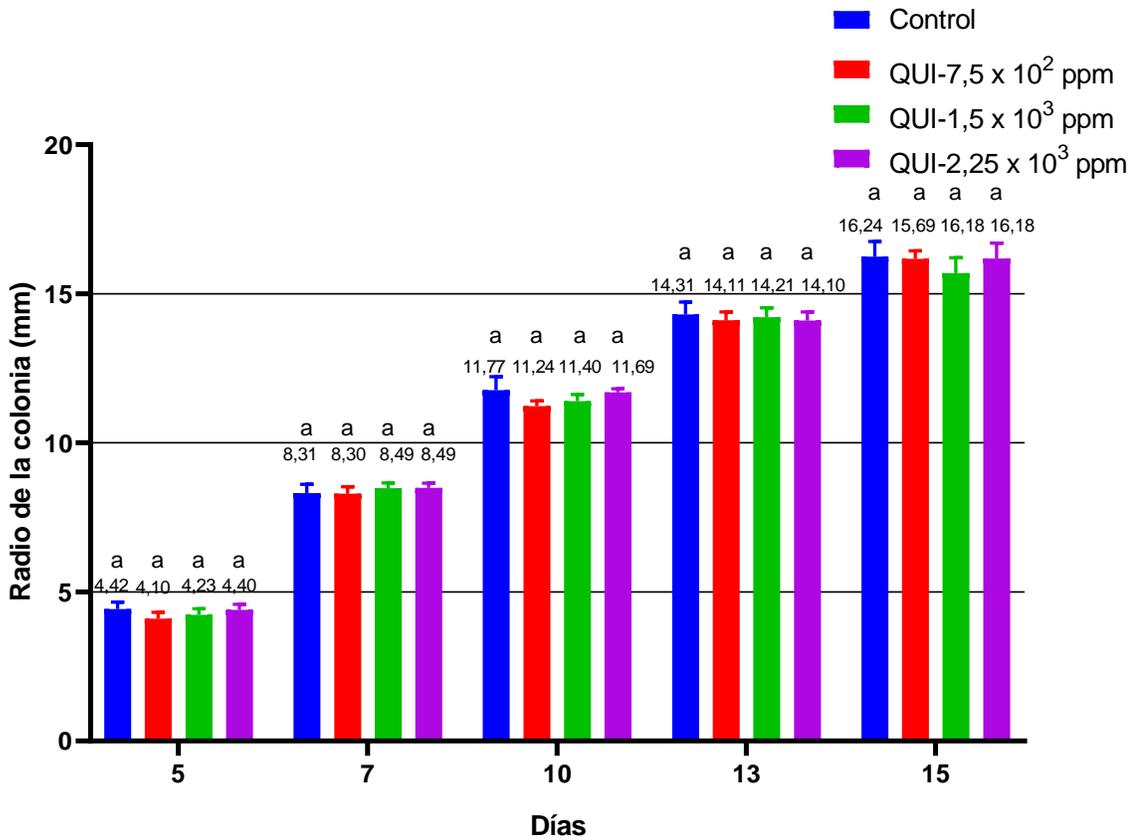


Figura 11. Crecimiento de *P. carneus* MAU 179 sobre quitosano los días 5, 7, 10, 13 y 15 post inoculación. La gráfica presenta el radio de las colonias (mm) en los 5 días de medición para los cuatro tratamientos: Control, QUI-7,5 x 10² ppm, QUI-1,5 x 10³ ppm y QUI-2,25 x 10³ ppm. Los valores de la gráfica se obtuvieron de cuatro repeticiones por tratamiento. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó ANOVA de una vía y una prueba de comparación LSD de Fisher para los días 5, 7, 13 y 15. Para el día 10 se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. Medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p \geq 0,05$).

En el caso de *M. brunneum* RGM 447, en las cinco mediciones (días 5, 7, 10, 13 y 15) se vieron diferencias significativas ($p < 0,05$). Para el día 5 tanto a 1,5 x 10³ ppm como a 2,25 x 10³ ppm de quitosano (4,89 y 4,82 mm, respectivamente) se vio un incremento del radio de la colonia respecto al 7,5 x 10² ppm de quitosano (2,93 mm)

y al control (2,51 mm), los que no obtuvieron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre sí (**Figura 12**).

En el día 7 se observó un incremento significativo del radio de la colonia ($p < 0,05$) para las concentraciones de $1,5 \times 10^3$ ppm y $2,25 \times 10^3$ ppm (13,06 mm y 12,62 mm, respectivamente) respecto al control (10,16 mm) y a la concentración de $7,5 \times 10^2$ ppm quitosano (10,95 mm). En el día 10, el radio de las colonias en los tratamientos de $1,5 \times 10^3$ ppm y $2,25 \times 10^3$ ppm de quitosano (17,23 y 16,75 mm, respectivamente) fue significativamente mayor respecto al control (14,33 mm), no así al aplicar $7,5 \times 10^2$ ppm de quitosano (14,69 mm), la cual no presentó diferencias significativas respecto al control ($p \geq 0,05$) (**Figura 12**).

Se mantuvo un comportamiento similar en el crecimiento de los hongos en los días 13 y 15, donde hubo un aumento significativo ($p < 0,05$) en el radio de la colonia de los tratamientos con $1,5 \times 10^3$ ppm y $2,25 \times 10^3$ ppm de quitosano. En el día 13 el tamaño radial del micelio fue de 21,33 mm y 20,99 mm para las concentraciones de $1,5 \times 10^3$ ppm y $2,25 \times 10^3$ ppm, respectivamente, y de 18,37 mm y 18,46 mm para la concentración de $7,5 \times 10^2$ ppm y el control, respectivamente. Para el día 15, los valores fueron de 24,14 mm y 23,61 mm para las concentraciones $1,5 \times 10^3$ ppm y $2,25 \times 10^3$ ppm de quitosano, respectivamente, y de 20,96 mm para la concentración de $7,5 \times 10^2$ ppm y 21,35 mm en el caso del control (**Figura 12**).

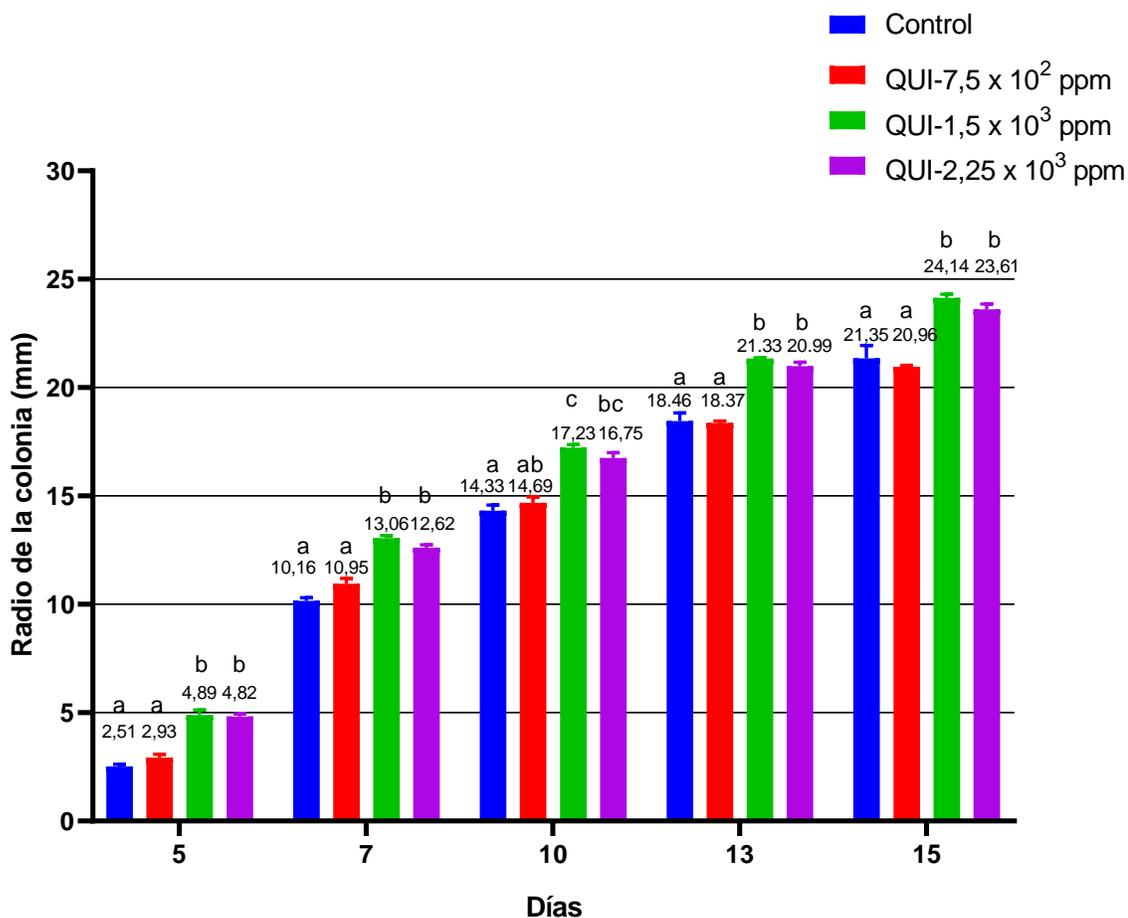


Figura 12. Crecimiento de *M. brunneum* RGM 447 sobre quitosano los días 5, 7, 10, 13 y 15 post inoculación. La gráfica presenta el radio de las colonias (mm) en los 5 días de medición para los cuatro tratamientos: Control, QUI-7,5 x 10² ppm, QUI-1,5 x 10³ ppm y QUI-2,25 x 10³ ppm. Los valores de la gráfica se obtuvieron de cuatro repeticiones por tratamiento. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó ANOVA de una vía y una prueba de comparación LSD de Fisher para los días 5, 7, 13 y 15. Para el día 10 se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. Medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p \geq 0,05$).

11.4 Parasitismo fúngico *in vitro* sobre *Steinernema australe* en presencia de quitosano

En el caso de las cepas *M. brunneum* RGM 447, *P. carneus* MAU 179 y *M. rubescens* RGM 1600 se observó parasitismo en los distintos tratamientos, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre ninguno de los

tratamientos, en los dos períodos evaluados. Los resultados de las cepas *M. brunneum* RGM 447, *P. carneus* MAU 179 y *M. rubescens* RGM 1600 se presentan en las **Figura 13**, **Figura 14** y **Figura 15**, respectivamente.

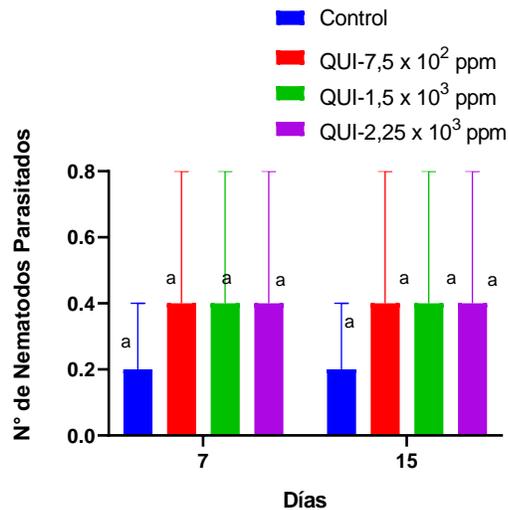


Figura 13. Efecto del quitosano en el número de nematodos parasitados por *M. brunneum* RGM 447. Gráfica del número de nematodos parasitados para los distintos tratamientos en los días 7 y 15 post inoculación del hongo. Para el análisis estadístico de los resultados se usó la prueba de Kruskal-Wallis. Medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p \geq 0,05$).

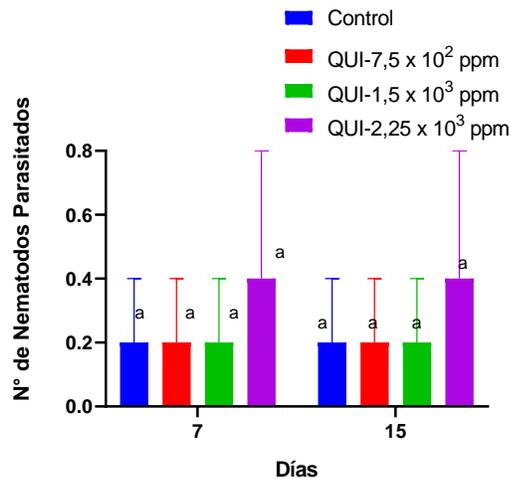


Figura 14. Efecto del quitosano en el número de nematodos parasitados por *P. carneus* MAU 179. Gráfica del número de nematodos parasitados para los distintos tratamientos en los días 7 y 15 post inoculación del hongo. Para el análisis estadístico de los resultados se usó la prueba de Kruskal-Wallis. Medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p \geq 0,05$).

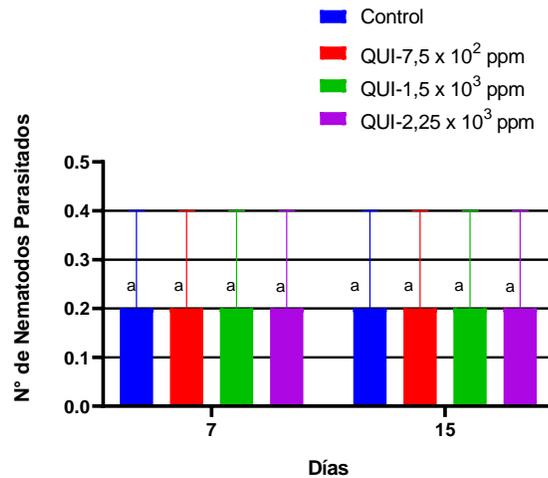


Figura 15. Efecto del quitosano en el número de nematodos parasitados por *M. rubescens* RGM 1600. Gráfica del número de nematodos parasitados para los distintos tratamientos en los días 7 y 15 post inoculación del hongo. Para el análisis estadístico de los resultados se usó la prueba de Kruskal-Wallis. Medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p \geq 0,05$).

Como se observa en la **Figura 16** *Trichoderma* sp. JFD1_61-2 presentó parasitismo sobre *S. australe* tras 15 días de incubación. Sin embargo, en el día 7 se observó diferencias significativas en ninguno de los tratamientos respecto al control. En el día 15 hubo diferencias ($p < 0,05$) en la cantidad de nematodos parasitados entre el tratamiento QUI-2,25 x 10³ ppm (1,4 nematodos parasitados) y el control (0,2 nematodos), pero en los otros dos tratamientos con quitosano, 7,5 x 10² ppm (0,8 nematodos parasitados) y 1,5 x 10³ ppm (0,6 nematodos parasitados) no se observaron diferencias con respecto al control.

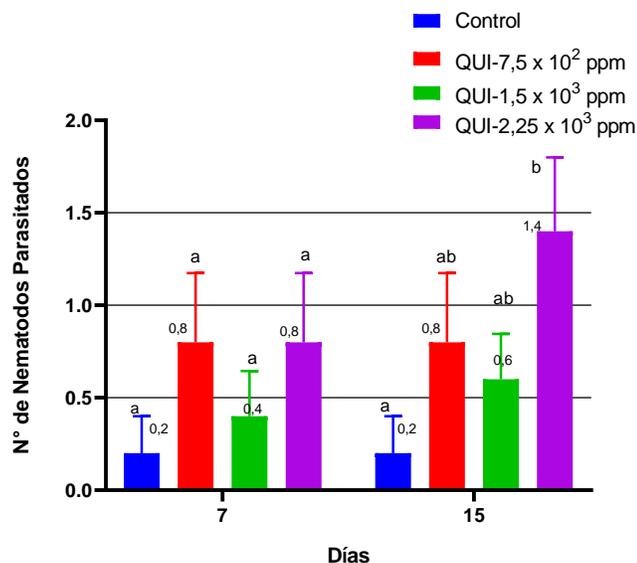


Figura 16. Efecto del quitosano en el número de nematodos parasitados por *Trichoderma* sp. JFD1_61-2. Gráfica del número de nematodos parasitados para los distintos tratamientos en los días 7 y 15 post inoculación del hongo. Para el análisis estadístico de los resultados se usó ANOVA de una vía y prueba LSD de Fisher. Medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p \geq 0,05$).

Respecto a *B. peruviansis* RGM 644, esta cepa mostró actividad parasitaria desde la primera medición. Como se observa en la **Figura 17** en el día 7 los tratamientos de $1,5 \times 10^3$ ppm (8,0 nematodos parasitados) y $2,25 \times 10^3$ ppm de quitosano (13,8 nematodos parasitados) fueron significativamente mayores en cuanto al número de nematodos parasitados en comparación al tratamiento de $0,75 \times 10^2$ ppm de quitosano (2,0 nematodos parasitados) y al control. En el día 15 se observó un mayor número de nematodos parasitados en el tratamiento de $1,5 \times 10^3$ ppm (9 nematodos parasitados) y $2,25 \times 10^3$ ppm de quitosano (14,2 nematodos parasitados) comparado al resto de los tratamientos. Por otra parte, no se observaron diferencias entre el tratamiento de $0,75 \times 10^2$ ppm quitosano y el control ($p \geq 0,05$).

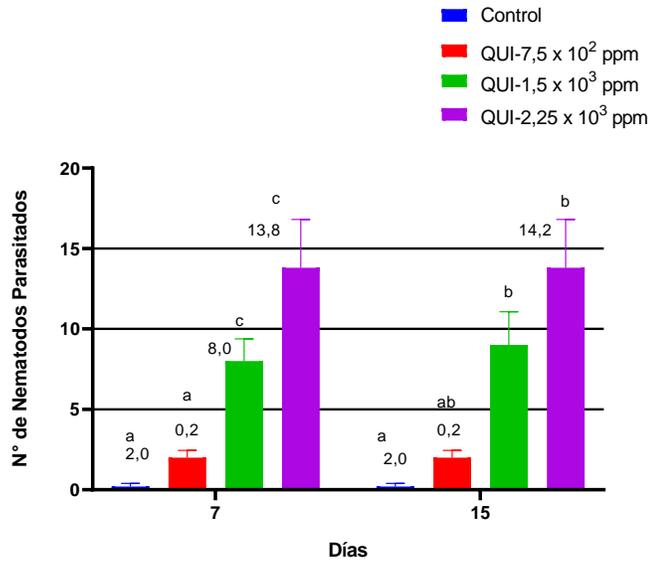


Figura 17. Efecto del quitosano en el número de nematodos parasitados por *Beauveria peruviana* RGM 644. Gráfica del número de nematodos parasitados para los distintos tratamientos en los días 7 y 15 post inoculación. Para el análisis estadístico de los resultados se usó ANOVA de una vía y prueba LSD de Fisher para el día 7, y la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos para el día 15. Medias con una letra en común no son significativamente distintas ($p < 0,05$).

Como se observa en la **Figura 18** *Trichoderma* sp. JFD1_61-2 parasitó a *S. australe*, presentando micosis externa a través del estoma o aparato bucal del nematodo. Por su parte, *B. peruviana* RGM 644 también parasitó a *S. australe*, como se observa en la **Figura 19** ya en una etapa avanzada de micosis.

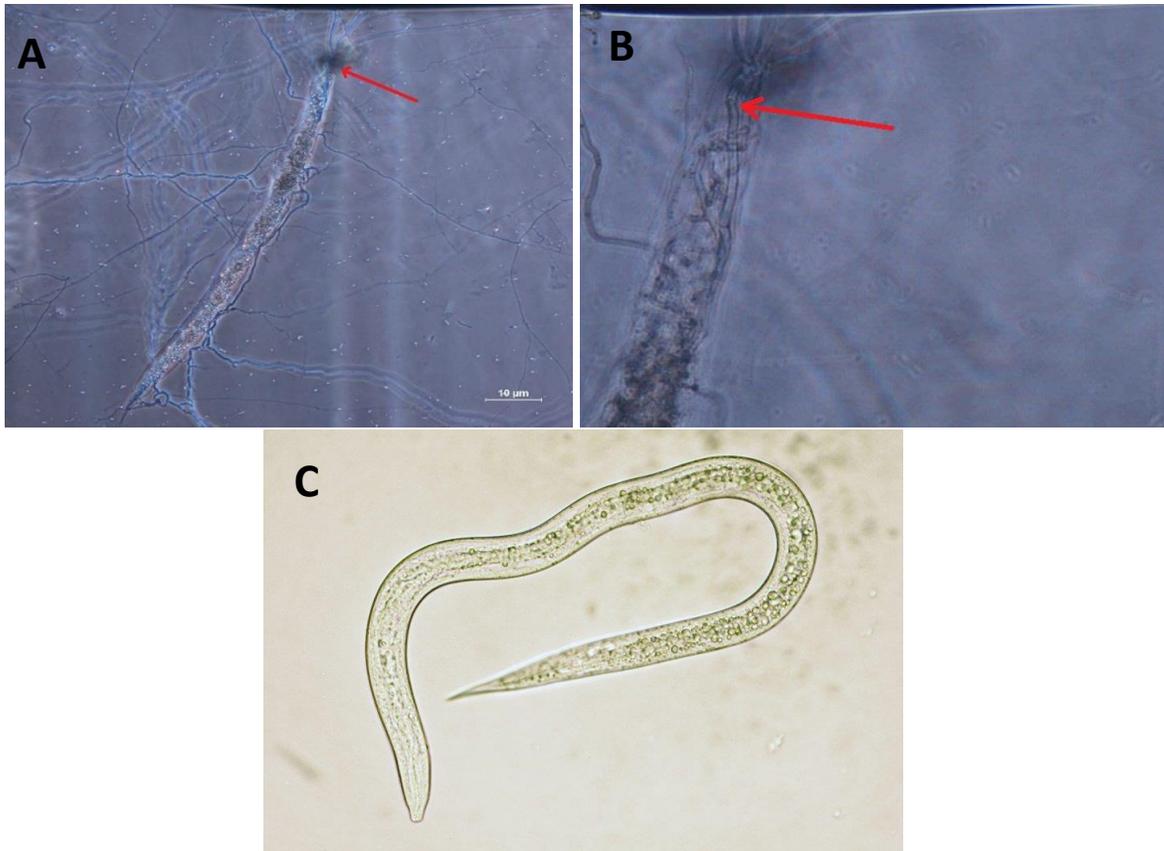


Figura 18. Parasitismo de *Trichoderma* sp. JFD1_61-2 sobre *S. australe*. Visualizado en 10X (A) y 40X (B). En A y B se observa el crecimiento de hifas en el interior del nematodo, señalado por las flechas rojas. En C se observa un nematodo no parasitado.



Figura 19. Parasitismo de *B. peruviansis* RGM 644 sobre *S. australe*. Visualizado en 10X (A) y 40X (B). En las fotos se observa el crecimiento de hifas en el interior del nematodo, señalado por las flechas rojas.

12. DISCUSIÓN

12.1 Colonización endofítica en tomate por cepas de fúngicas nematófagas

La cepa *Trichoderma* sp. JFD1_61-2, la cepa *M. rubescens* RGM y la cepa *P. carneus* MAU 179 resultaron ser endófitas de tomate. Por el momento, *P. carneus* no ha sido reportado como endófito en la literatura, mientras que *M. rubescens* ha sido reportada como una especie endofítica en cebada (*Noccaea caeurulenscens*) aislada desde raíz (Yung *et al.*, 2021). En contraste, ni la cepa de *M. brunneum* ni la cepa de *B. bassiana* analizadas lograron colonizar tomate en este trabajo (Yung *et al.*, 2021). No obstante, hay evidencia que estas especies son endofíticas en tomate, inclusive la cepa *B. peruviansis* RGM 644 ha mostrado colonizar sistémicamente esta especie vegetal (Barra-Bucareri *et al.*, 2019; Barra-Bucareri *et al.*, 2020; Rasool *et al.*, 2021). Lo anterior podría explicarse por los distintos factores de los que depende el proceso de colonización endofítica tales como la especie, la localización y tipo de tejido de la planta hospedera (Rumbos *et al.*, 2006; Tucci *et al.*, 2011; Behie *et al.*, 2015;), el método por el cual se inocula la planta (Wei *et al.*, 2020), el tipo de cepa y taxón del microorganismo (Bailey *et al.*, 2005), la etapa de crecimiento en la que esté la planta (Bamisile *et al.*, 2020) y la concentración de conidias usadas (Toffa *et al.*, 2021). Además, los componentes bióticos (como la composición de la microbiota local) y abióticos (como el tipo de suelo, radiación UV y las temperaturas extremas) también deben pueden modular la colonización endofítica (Pimentel *et al.*, 2006; Tefera & Vidal, 2009; Eschen *et al.*, 2010; Karliński *et al.*, 2010; Lovett *et al.*, 2015).

12.2 Crecimiento fúngico en presencia de quitosano

La cepa JFD1_61-2 de *Trichoderma* sp. presenta crecimiento de sus estructuras aéreas (hifas y conidióforos), suplementado con quitosano (concentraciones $7,5 \times 10^2$ ppm, $1,5 \times 10^3$ ppm y $2,25 \times 10^3$ ppm), se observaron diferencias significativas únicamente en el día 3 post inoculación, donde el hongo en presencia de $2,25 \times 10^3$ ppm de quitosano presentó un tamaño de colonia menor respecto al control sin quitosano. No obstante, al cabo de 4 días de incubación todos los tratamientos lograron cubrir completamente la superficie de la placa de Petri, indicando que esta cepa puede crecer en presencia de dichas concentraciones de quitosano. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Zavala *et al.* (2016), quienes evaluaron el crecimiento de *T. neocrassum* junto con *T. koningiopsis*, *T. harzianum*, *T. citrinoviride* y *T. pseudonninggi* a diferentes concentraciones de quitosano (5×10^2 ppm; $1,0 \times 10^3$ ppm y $2,0 \times 10^3$ ppm). Los autores reportaron que todas las especies exhibieron una reducción significativa en el crecimiento de hifas excepto *T. koningiopsis*, la que no se vio afectada a 5×10^2 ppm y 1×10^3 ppm de quitosano. En un estudio realizado por Palma-Guerrero *et al.* (2008) las especies *T. harzianum* y *T. atroviride* presentaron una inhibición en su crecimiento micelar en distintos medios de cultivo suplementados con 2×10^3 ppm de quitosano. Posteriormente, en otro estudio de Palma-Guerrero *et al.* (2010) se reportó que sobre los $0,1 \times 10^3$ ppm de quitosano el crecimiento de *T. harzianum* fue nulo respecto al control. La susceptibilidad o tolerancia al quitosano entre especies del mismo género puede explicarse por la diferencia en la fluidez de la membrana plasmática, la que se relaciona con la

composición de ácidos grasos insaturados que hay en ésta (Palma-Guerrero *et al.*, 2010). Se ha demostrado que aquellas especies del género *Trichoderma* cuyo crecimiento fúngico se ve inhibido en presencia de quitosano poseen una membrana rica en ácidos grasos poliinsaturados, a diferencia de otras especies tolerantes como *T. koningiopsis* que tienen un menor contenido de ácidos grasos poliinsaturados, lo que impide el ingreso del polímero al espacio intracelular donde puede desencadenar su efecto antimicrobiano causado por la inhibición de la síntesis proteica, de ácidos nucleicos y afectar la actividad mitocondrial (Dutta *et al.*, 2012; Zavala *et al.*, 2016).

La cepa RGM 644 de *B. peruviana* presentó tolerancia a quitosano en las tres concentraciones estudiadas, la cual mostró diferencias significativas al día 15 entre las concentraciones de $7,5 \times 10^2$ ppm y $2,25 \times 10^3$ ppm de quitosano, disminuyendo el tamaño de la colonia a la concentración más baja e incrementándose a la concentración más alta, respecto al control. Los resultados obtenidos en la presente investigación son similares a los obtenidos por Palma-Guerrero *et al.* (2008), donde se observó que la especie *B. bassiana* aumentó el crecimiento de colonia en tres concentraciones de quitosano (5×10^2 ppm; $1,0 \times 10^3$ ppm y $2,0 \times 10^3$ ppm), demostrando un mayor incremento a los 2×10^3 ppm respecto del control. Un estudio similar mostró que una cepa de *B. bassiana* presentó tolerancia a distintas concentraciones de quitosano ($0,1 \times 10^3$ ppm; 5×10^2 ppm; $1,0 \times 10^3$ ppm y $2,0 \times 10^3$ ppm). También se observó que a los 1×10^2 ppm de quitosano el porcentaje de crecimiento aumentó de manera significativa por sobre el control y a los 2×10^3 ppm de quitosano se produjo una leve inhibición del crecimiento

(Palma-Guerrero *et al.*, 2010), contrario a lo reportado en su estudio previo (Palma-Guerrero *et al.*, 2008).

En cuanto a la cepa RGM 1600 de *M. rubescens*, además de presentar tolerancia frente a quitosano mostró que a $2,25 \times 10^3$ ppm del compuesto se estimula el radio de la colonia del micelio en las condiciones estudiadas. Comparando con el estudio de Palma-Guerrero *et al.* (2008) se observó que la especie *M. rubescens* a una concentración de 2×10^3 ppm de quitosano se presenta un aumento significativo en el radio de la colonia, similar a los presentados por la cepa RGM 1600 que pertenece a la misma especie.

En el caso de la cepa RGM 447 de *M. brunneum*, presentó tolerancia a quitosano y se observó un aumento significativo en el radio de la colonia en los tratamientos de $1,5 \times 10^3$ ppm y $2,25 \times 10^3$ ppm de quitosano en comparación al control, estimulando el crecimiento del hongo. Este efecto puede compararse al observado en un estudio de Aranda-Martinez *et al.* (2016), donde la especie *M. anisoplae* mostró un crecimiento progresivo en medio líquido suplementado con 5×10^3 ppm de quitosano alrededor de 20 días, comparando con el control. El mismo estudio muestra un comportamiento similar para *B. bassiana*, reforzando la idea que el quitosano estimula el crecimiento vegetativo en este tipo de hongos.

La cepa MAU 179 de *P. carneus* resultó ser tolerante a quitosano, sin mostrar diferencias entre el control y los tratamientos con quitosano. Estos resultados son similares a los obtenidos por Palma-Guerrero *et al.* (2008), donde otra especie del género, *P. lilacinus*, mostró tolerancia a distintas concentraciones de quitosano e inclusive aumentó significativamente su tamaño de colonia a los 2×10^3 ppm del

compuesto, respecto al control. En su estudio del 2010 mostró un comportamiento similar, solo que a los 2×10^3 ppm de quitosano *P. lilacinus* presentó una leve inhibición en el crecimiento (Palma-Guerrero *et al.*, 2010).

12.3 Parasitismo fúngico *in vitro* sobre *S. australe* en presencia de quitosano

La presente investigación confirmó que el quitosano puede aumentar el parasitismo de HNs en el nematodo cebo *S. australe*. Los resultados obtenidos por Escudero *et al.* (2016) en *P. chlamydosporia* son similares a los obtenidos con las cepas *B. peruviansis* RGM 644 y *Trichoderma* sp. JFD1_61-2 utilizadas en esta investigación, ya que en su estudio se observó que al usar quitosano a concentraciones de 1×10^3 ppm y 2×10^3 ppm en conjunto con *P. chlamydosporia* se aumentó significativamente el número de huevos parasitados del NF *Meloidogyne* por dicho hongo en comparación al tratamiento en ausencia de quitosano. Por otro lado, cabe destacar que hasta el momento no se han reportado estudios sobre la actividad nematófaga de *B. peruviansis*; no obstante, el clado *B. peruviansis* es el más cercano al de las cepas de *B. bassiana* (**Figura 2**), especie cuya capacidad para controlar NFs ha sido ampliamente estudiada (Liu *et al.*, 2008; Youssef *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Esta proximidad en la distancia genética podría explicar por qué la cepa RGM 644 presentó actividad nematófaga. Al tener un aumento de la actividad parasitaria en ambas cepas, particularmente RGM 644, pueden considerarse como buenos candidatos para agentes de biocontrol frente a nematodos fitopatógenos.

El efecto que el quitosano ejerce sobre el parasitismo observado en este trabajo en condiciones *in vitro* puede compararse al obtenido por un estudio realizado en

condiciones de invernadero con soja en presencia del nematodo *Heterodera glycines*, el cual presentó un aumento en el parasitismo de nematodos por el HN *Hirsutella minnesotensis* tras la aplicación de 1 g/mL de quitosano. Además, se observó que en dichas condiciones aumentó la población rizosférica de HNs como *Pochonia* y *Paecilomyces* (Mwaheb *et al.*, 2017). En contraste, un trabajo similar de Escudero *et al.* (2017) en condiciones de invernadero realizado en tomate inoculado con *P. chlamydosporia* no mostró cambios en el parasitismo de masas de huevos del nematodo *M. javanica* en suelo suplementado con 0,1 mg/ mL de quitosano. Por otra parte, se ha observado que en *T. harzianum* se puede aumentar su biocontrol sobre *M. incognita* en suelo suplementado con 1,5 mg/ kg de quitosano, disminuyendo el número de agallas, masas de huevo y hembras adultas en raíces de tomate, en comparación a la aplicación del hongo sin quitosano y al control. Cabe destacar que se observó un efecto aún mayor al combinarlo con humato de potasio (Ahmed & Omara, 2018), dejando en evidencia que el quitosano es un compuesto que potencia el parasitismo en algunos HNs.

12.4 Proyecciones

La presente Memoria de Título es el primer reporte sobre el efecto del quitosano en el parasitismo de especies de hongos endofitos nativos sobre el nematodo cebo *S. australe*, sobre el endofitismo de especies como *P. carneus* y *M. rubescens*, y también sobre la capacidad nematófaga de *B. peruviansis*.

El trabajo realizado en la presente Memoria de Título sobre hongos nematófagos endófitos, se podría complementar con estudios de propiedades benéficas de estos hongos hacia la planta como, por ejemplo, determinar si dichas cepas pueden

estimular el crecimiento de plantas de tomate. Estudios de este tipo ya se han realizado en la cepa RGM 644 por Barra-Bucarei *et al.* (2019 y 2020).

Las cepas con potencial biocontrol de nematodos JFD1_61-2 y RGM 644 estudiadas en esta Memoria de Título podrían utilizarse para futuros ensayos de interacción tritrófica entre una planta, algún nematodo fitopatógeno (Ej. *Meloidogyne* spp) y un HN en conjunto con quitosano, de forma similar al realizado por Escudero *et al.* (2017) y Ahmed & Omara (2018), con el fin de determinar el efecto sinérgico entre el quitosano y estas cepas fúngicas nematófagas endófitas nativas en condiciones de invernadero.

Además, podría plantearse a futuro escalar a ensayos a nivel de cultivo mediante la masificación de formulaciones con quitosano y conidias, usando un tratamiento combinado de éstas dos cepas. Por ejemplo, aplicando JFD1_61-2 al suelo y RGM 644 a nivel foliar, con el fin de aumentar la cantidad y diversidad microbiana benéfica. Esto podría ser factible ya que la cepa RGM 644 actualmente es utilizada en productos precomerciales como Endomix B1 y B4, utilizados para la estimulación de crecimiento y biocontrol de hongos e insectos fitopatógenos (<http://www.endofitos.com/ENDOMIX/>).

13. CONCLUSIONES

- 1) Las cepas fúngicas nativas MAU 179, RGM 1600, RGM 644 y RGM 447 fueron identificadas a nivel de especies como *P. carneus*, *M. rubescens*, *B. peruviansis* y *M. brunneum*, respectivamente, mientras que con los métodos usados no se puede determinar la especie de la cepa de *Trichoderma* JFD1_61-2.
- 2) Se determinó que las cepas MAU 179 de *P. carneus*, RGM 1600 de *M. rubescens* y JFD1_61-2 de *Trichoderma* sp. presentan capacidad de colonización endofítica en *S. lycopersicum*. Por su parte, la cepa RGM 447 de *M. brunneum* no colonizó internamente los tejidos de especie vegetal bajo las condiciones estudiadas.
- 3) Las cepas MAU 179 *P. carneus*, RGM 1600 *M. rubescens*, RGM 644 *B. peruviansis*, RGM 447 *M. brunneum* y JFD1_61-2 *Trichoderma* sp. demostraron distintos grados de tolerancia distintas concentraciones de quitosano debido a que presentaron crecimiento micelial. Tanto la cepa de *M. brunneum* RGM 447 como la cepa *B. peruviansis* RGM 644 presentaron un incremento en el crecimiento micelial cuando se utilizaron las mayores concentraciones de este compuesto, por lo que podría ser usado como un aditivo estimulante de crecimiento de dichos hongos.
- 4) El quitosano contribuye a la actividad parasitaria de las cepas nativas RGM 644 y JFD1_61-2 en el nematodo *S. australe*. La actividad parasitaria de las cepas RGM 447, RGM 1600 y MAU 179 sobre *S. australe* no se vio afectada por la presencia quitosano en las condiciones de este estudio.

14. REFERENCIAS

1. Abad, P., Castagnone-Sereno, P., Rosso, M. N., Engler, J. D. A., & Favery, B. (2009). Invasion, feeding and development. *Root-knot nematodes*, 163-181.
2. Ahmed, N., & Omara, A. E. D. (2018). Efficiency of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent in combination with humate and chitosan against *Meloidogyne incognita* on tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(11-12), 673-683.
3. Al-Hazmi, A. S., & TariqJaveed, M. (2016). Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. *Saudi journal of biological sciences*, 23(2), 288-292.
4. Aranda-Martinez, A., Naranjo Ortiz, M. Á., Abihssira García, I. S., Zavala-Gonzalez, E. A., & Lopez-Llorca, L. V. (2017). Ethanol production from chitosan by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Microbiological research*, 204, 30-39.
5. Armendáriz, I., Quiña, D., Ríos, M., & Landázuri, P. (2015). Nematodos fitopatógenos y sus estrategias de control. Sangolqui, Ecuador. *ESPE-Universidad de las Fuerzas Armadas*, 12-42
6. Ashraf, M. S., & Khan, T. A. (2010). Integrated approach for the management of *Meloidogyne javanica* on eggplant using oil cakes and biocontrol agents. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(6), 609-614.
7. Asif, M., Ahmad, F., Tariq, M., Khan, A., Ansari, T., Khan, F., & Siddiqui, A. M. (2017). Potential of chitosan alone and in combination with agricultural wastes against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting eggplant. *Journal of plant protection research*, 57(3), 288-295.
8. Bailey J., Deckert R., Schweitzer J., Rehill B., Lindroth R., Gehring C., & Whitham T. (2005). Host plant genetics affect hidden ecological players: links among *Populus*, condensed tannins, and fungal endophyte infection. *Canadian Journal of Botany* 83, 356-361.
9. Bamisile, B. S., Senyo Akutse, K., Dash, C. K., Qasim, M., Ramos Aguila, L. C., Ashraf, H. J., Huang, W., Hussain, M., Chen, S., & Wang, L. (2020). Effects of Seedling Age on Colonization Patterns of *Citrus limon* Plants by Endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and Their Influence on Seedlings Growth. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 6(1), 29.
10. Barra-Bucarei, L., France Iglesias, A., Gerding González, M., Silva Aguayo, G., Carrasco-Fernández, J., Castro, J. F., & Ortiz Campos, J. (2019). Antifungal Activity of *Beauveria bassiana* Endophyte against *Botrytis cinerea* in Two *Solanaceae* Crops. *Microorganisms*, 8(1), 65.
11. Barra-Bucarei, L., González, M. G., Iglesias, A. F., Aguayo, G. S., Peñalosa, M. G., & Vera, P. V. (2020). *Beauveria bassiana* Multifunction as an Endophyte:

- Growth Promotion and Biologic Control of *Trialeurodes vaporariorum*, (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) in Tomato. *Insects*, 11(9), 591.
12. Behie, S. W., Jones, S. J., & Bidochka, M. J. (2015). Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology*, 13, 112-119.
 13. Boedeker, W., Watts, M., Clausing, P., & Marquez, E. (2020). The global distribution of acute unintentional pesticide poisoning: estimations based on a systematic review. *BMC public health*, 20(1), 1875.
 14. Brown, P. D. (1997). Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Adv. Agron.*, 61, 168-231.
 15. Bulathsinghala, A. T., & Shaw, I. C. (2014). The toxic chemistry of methyl bromide. *Human & experimental toxicology*, 33(1), 81-91.
 16. Bustos S., San Martin C. (2019). *Viveros frutales: plagas reglamentadas y las principales obligaciones*. Segunda Edición del Servicio Agrícola y Ganadero. *División Protección Agrícola y Forestal*. 68 p.
 17. Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(15), 1972-1973.
 18. Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.
 19. Dackman, C., & Nordbring-Hertz, B. (1985). Fungal Parasites of the Cereal Cyst Nematode *Heterodera avenae* in Southern Sweden. *Journal of nematology*, 17(1), 50-55.
 20. Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L. G. D., Lopes, E. A., Silva, M. D. C. S. D., Kasuya, M. C. M., & Ferraz, S. (2015). *Pochonia chlamydosporia* promotes the growth of tomato and lettuce plants. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37, 417-423.
 21. Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Pereira, O.L., Zooca, R.J.F. & Ferraz, S. (2012). Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. *Crop Protect.* 42, 102-107.
 22. Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of biochemistry and biophysics*, 274(2), 532-538.
 23. DiLegge, M. J., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2019). A novel approach to determine generalist nematophagous microbes reveals *Mortierella globalpina* as a new biocontrol agent against *Meloidogyne* spp. nematodes. *Scientific reports*, 9(1), 7521.
 24. Dutta, J., Tripathi, S., & Dutta, P. K. (2012). Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food science and technology international*, 18(1), 3-34.
 25. El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine drugs*, 8(4), 968-987.
 26. Eschen, R., Hunt, S., Mykura, C., Gange, A. C., & Sutton, B. C. (2010). The foliar endophytic fungal community composition in *Cirsium arvense* is affected

- by mycorrhizal colonization and soil nutrient content. *Fungal biology*, 114(11-12), 991-998.
27. Escudero, N., Ferreira, S. R., Lopez-Moya, F., Naranjo-Ortiz, M. A., Marin-Ortiz, A. I., Thornton, C. R., & Lopez-Llorca, L. V. (2016). Chitosan enhances parasitism of *Meloidogyne javanica* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal biology*, 120(4), 572-585.
 28. Escudero, N., & Lopez-Llorca, L. V. (2012). Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Symbiosis*, 57(1), 33-42.
 29. Escudero, N., Lopez-Moya, F., Ghahremani, Z., Zavala-Gonzalez, E. A., Alaguero-Cordovilla, A., Ros-Ibañez, C., Lacasa, A., Sorribas, F. J., & Lopez-Llorca, L. V. (2017). Chitosan Increases Tomato Root Colonization by *Pochonia chlamydosporia* and Their Combination Reduces Root-Knot Nematode Damage. *Frontiers in plant science*, 8, 1415.
 30. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2020. FAOSTAT Cultivos y Productos de Ganadería [online]. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
 31. Gao, S., Meng, W., Zhang, L., Yue, Q., Zheng, X., & Xu, L. (2021). *Parametarhizium* (*Clavicipitaceae*) gen. nov. With Two New Species as a Potential Biocontrol Agent Isolated From Forest Litters in Northeast China. *Frontiers in microbiology*, 12, 627744.
 32. Ghayedi, S., & Abdollahi, M. (2013). Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae), isolated from suppressive soils of the Boyer-Ahmad region, Iran, against J2s of *Heterodera avenae*. *Journal of Plant Protection Research*, 53(2), 165-171.
 33. Gurulingappa, P., Sword, G. A., Murdoch, G., & McGee, P. A. (2010). Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *Biological control*, 55(1), 34-41.
 34. Hajek, A. E., & Eilenberg, J. (2018). Natural enemies: an introduction to biological control (pp. 22-37) *Cambridge University Press*.
 35. Hubka, V., & Kolarik, M. (2012). β -tubulin paralogue *tubC* is frequently misidentified as the *benA* gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia*, 29, 1-10.
 36. Inglis, P. W., & Tigano, M. S. (2006). Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 29(1), 132-136.
 37. Jaronski, S. T. (2010). Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl*, 55(1), 159-185.
 38. Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 14(9), 946-961.

39. Jyoti, S., & Singh, D. (2017). Fungi as biocontrol agents in sustainable agriculture. *Microbes and environmental management. Studium Press, New Delhi*, 172-194.
40. Karliński, L., Rudawska, M., Kieliszewska-Rokicka, B., & Leski, T. (2010). Relationship between genotype and soil environment during colonization of poplar roots by mycorrhizal and endophytic fungi. *Mycorrhiza*, 20(5), 315-324.
41. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14), 3059-3066.
42. Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 3-11.
43. Kepler, R. M., & Rehner, S. A. (2013). Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Molecular ecology resources*, 13(2), 210-217.
44. Khonsanit, A., Luangsa-ard, J. J., Thanakitpipattana, D., Noisripoom, W., Chaitika, T., & Kobmoo, N. (2020). Cryptic diversity of the genus *Beauveria* with a new species from Thailand. *Mycological progress*, 19(4), 291-315.
45. Kim, K. H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *The Science of the total environment*, 575, 525-535.
46. Kondo, N., Tokiwa, T., Sato, K., Ōmura, S., & Nonaka, K. (2020). *Metapochonia hahajimaensis* (Clavicipitaceae, Hypocreales), a new species from soil in Hahajima Island, Tokyo, Japan. *Mycoscience*, 61(6), 337-341.
47. Kratochvil, R. J., Sardanelli, S., Everts, K., & Gallagher, E. (2004). Evaluation of crop rotation and other cultural practices for management of root-knot and lesion nematodes. *Agronomy Journal*, 96(5), 1419-1428.
48. Krell, V., Jakobs-Schoenwandt, D., Vidal, S., & Patel, A. V. (2018). Encapsulation of *Metarhizium brunneum* enhances endophytism in tomato plants. *Biological control*, 116, 62-73.
49. Kwak Y. (2021). An Update on *Trichoderma* Mitogenomes: Complete *De Novo* Mitochondrial Genome of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* (Hypocreales, Sordariomycetes), an Ex-Neotype Strain CBS 226.95, and Tracing the Evolutionary Divergences of Mitogenomes in *Trichoderma*. *Microorganisms*, 9(8), 1564.
50. Laflamme, P., Benhamou, N., Bussières, G. & Dessureault, M. (1999) Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Canadian Journal of Botany* 77, 1460-1468.
51. Larriba, E., Jaime, M. D., Nislow, C., Martín-Nieto, J., & Lopez-Llorca, L. V. (2015). Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. *Journal of plant research*, 128(4), 665-678.

52. Li, J., Zou, C., Xu, J., Ji, X., Niu, X., Yang, J., Huang, X., & Zhang, K. Q. (2015). Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: basis for biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual review of phytopathology*, *53*, 67-95.
53. Liu, T., Wang, L., Duan, Y. X., & Wang, X. (2008). Nematicidal activity of culture filtrate of *Beauveria bassiana* against *Meloidogyne hapla*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(1), 113-118.
54. López-Llorca, L. V., & Robertson, W. M. (1993). Ultrastructure of infection of cyst nematode eggs by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. *Nematologica*, *39*(1-4), 65-74.
55. Lovett, B., & St Leger, R. J. (2015). Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. *Current genetics*, *61*(3), 253-261.
56. Maciá-Vicente, J. G., Rosso, L. C., Ciancio, A., Jansson, H. B., & Lopez-Llorca, L. V. (2009). Colonisation of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: effects on plant growth and disease. *Annals of Applied Biology*, *155*(3), 391-401.
57. Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. In *Plant, soil and microbes* (pp. 253-269). Springer, Cham.
58. Medeiros, H. A., Araújo Filho, J. V., Freitas, L. G., Castillo, P., Rubio, M. B., Hermosa, R., & Monte, E. (2017). Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Scientific reports*, *7*, 40216.
59. Melakeberhan, H., & Avendaño, F. (2008). Spatio-temporal consideration of soil conditions and site-specific management of nematodes. *Precision Agriculture*, *9*(6), 341-354.
60. Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *2010 gateway computing environments workshop (GCE)* (pp. 1-8).
61. Moens, M., Perry, R. N., & Starr, J. L. (2009). *Meloidogyne* species—a diverse group of novel and important plant parasites. *Root-knot nematodes*, *1*, 483.
62. Moreno-Gavira, A., Diáñez, F., Sánchez-Montesinos, B., & Santos, M. (2020). *Paecilomyces variotii* as a plant-growth promoter in horticulture. *Agronomy*, *10*(4), 597.
63. Mwaheb, M. A., Hussain, M., Tian, J., Zhang, X., Hamid, M. I., El-Kassim, N. A., N., Hassan G., Xiang M. & Liu, X. (2017). Synergetic suppression of soybean cyst nematodes by chitosan and *Hirsutella minnesotensis* via the assembly of the soybean rhizosphere microbial communities. *Biological control*, *115*, 85-94.
64. Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*, *32*(1), 268-274.

65. Nordbring-Hertz B., Jansson H.B., & Tunlid A. (2006). Nematophagous Fungi. *Wiley Blackwell, Hoboken, NJ*.
66. Nosratabadi, M., Kachuei, R., Rezaie, S., & Harchegani, A. B. (2018). Beta-tubulin gene in the differentiation of *Fusarium* species by PCR-RFLP analysis. *Le infezioni in medicina*, 26(1), 52-60.
67. Nthenga, I., Knoetze, R., Berry, S., Tiedt, L. R., & Malan, A. P. (2014). *Steinernema sacchari* n. sp (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology*, 16(4), 475-494.
68. O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2044-2049.
69. ODEPA (2021). Tomate: una especie de exportación. Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile, Santiago, Chile.
70. Olson, N. D., & Morrow, J. B. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC research notes*, 5, 668. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-668>
71. Palma-Guerrero, J., Jansson, H. B., Salinas, J., & Lopez-Llorca, L. V. (2008). Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of applied microbiology*, 104(2), 541-553.
72. Palma-Guerrero, J., Lopez-Jimenez, J. A., Pérez-Berná, A. J., Huang, I. C., Jansson, H. B., Salinas, J., Villalaín, J., Read, N. D., & Lopez-Llorca, L. V. (2010). Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular microbiology*, 75(4), 1021-1032.
73. Palomares-Rius, J. E., Escobar, C., Cabrera, J., Vovlas, A., & Castillo, P. (2017). Anatomical Alterations in Plant Tissues Induced by Plant-Parasitic Nematodes. *Frontiers in plant science*, 8, 1987.
74. Peiris, P., Li, Y., Brown, P., & Xu, C. (2020). Fungal biocontrol against *Meloidogyne* spp. in agricultural crops: A systematic review and meta-analysis. *Biological Control*, 144, 104235.
75. Pimentel, I., Glienke-Blanco, C., Gabardo, J., Stuart, R., & Azevedo, J. (2006). Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Brazilian archives of biology and technology*, 49(5), 705-711.
76. Poveda, J., Abril-Urias, P., & Escobar, C. (2020). Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance: *Trichoderma*, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. *Frontiers in microbiology*, 11, 992.
77. Qualhato, T. F., Lopes, F. A., Steindorff, A. S., Brandão, R. S., Jesuino, R. S., & Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against

- three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology letters*, 35(9), 1461-1468.
78. Rasool, S., Cárdenas, P. D., Pattison, D. I., Jensen, B., & Meyling, N. V. (2021). Isolate-Specific Effect of Entomopathogenic Endophytic Fungi on Population Growth of Two-Spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae* Koch) and Levels of Steroidal Glycoalkaloids in Tomato. *Journal of chemical ecology*, 47(4-5), 476-488.
 79. Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84-98.
 80. Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055-1073.
 81. Rodriguez, R. J., White, J. F., Jr, Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New phytologist*, 182(2), 314-330.
 82. Rumbos, C. I., & Kiewnick, S. (2006). Effect of plant species on persistence of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 in soil and on root colonization by the fungus. *Plant and Soil*, 283(1), 25-31.
 83. Schouten A. (2016). Mechanisms Involved in Nematode Control by Endophytic Fungi. *Annual review of phytopathology*, 54, 121-142.
 84. Seid, A., Fininsa, C., Mekete, T., Decraemer, W., & Wesemael, W.(2015). Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp)– a century-old battle. *Nematology*, 17(9), 995-1009.
 85. Senthilkumar, M., Anandham, R., & Krishnamoorthy, R. (2020). *Paecilomyces*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 793-808). Academic Press.
 86. Singh, S., Singh, B., & Singh, A. P. (2015). Nematodes: A Threat to Sustainability of Agriculture. *Procedia Environmental Sciences*, 29, 215-216.
 87. Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, A. (2017). Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. *3 Biotech*, 7(4), 255.
 88. Soares, F. E., Sufiate, B. L., & de Queiroz, J. H. (2018). Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. *Agriculture and Natural Resources*, 52(1), 1-8.
 89. Sorribas, F. J., Ornat, C., Galeano, M., & Verdejo-Lucas, S. (2003). Evaluation of a native and introduced isolate of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne javanica*. *Biocontrol Science and Technology*, 13(8), 707-714.
 90. Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsa-Ard, J. J., Shrestha, B., & Spatafora, J. W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in mycology*, 57, 5-59.
 91. Tefera, T., & Vidal, S. (2009). Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl*, 54(5), 663-669.

92. Toffa, J., Loko, Y., Kpindou, O., Zanzana, K., Adikpeto, J., Gbenontin, Y., Koudamilora A. & Adandonon, A. (2021). Endophytic colonization of tomato plants by *Beauveria bassiana* Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) and leaf damage in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1-9.
93. Tokatlı, K., & Demirdöven, A. (2018). Optimization of chitin and chitosan production from shrimp wastes and characterization. *Journal of food processing and preservation*, 42(2), e13494.
94. Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., & Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular plant pathology*, 12(4), 341-354.
95. Vega, F., Posada, F., Aime, M., Pava-Ripoll, M., Infante, F., & Rehner, S. (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological control*, 46(1), 72-82.
96. Wang, Y., Yu, H., Dai, Y., Wu, C., Zeng, W., Yuan, F., & Liang, Z. (2015). *Polycephalomyces agaricus*, a new hyperparasite of *Ophiocordyceps* sp. infecting melolonthid larvae in southwestern China. *Mycological Progress*, 14(9), 1-9.
97. Wei, Q., Li, Y., Xu, C., Wu, Y., Zhang, Y., & Liu, H. (2020). Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. *Arthropod-Plant Interactions*, 14(3), 289-300.
98. White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
99. Yang, J. I., Loffredo, A., Borneman, J., & Becker, J. O. (2012). Biocontrol Efficacy Among Strains of *Pochonia chlamydosporia* Obtained from a Root-Knot Nematode Suppressive Soil. *Journal of nematology*, 44(1), 67-71.
100. Youssef, M., El-Nagdi, W. & Lotfy, D. (2020). Evaluation of the fungal activity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* as biocontrol agents against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on cowpea. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1-11.
101. Yu, Z., Zhang, Y., Luo, W., & Wang, Y. (2015). Root colonization and effect of biocontrol fungus *Paecilomyces lilacinus* on composition of ammonia-oxidizing bacteria, ammonia-oxidizing archaea and fungal populations of tomato rhizosphere. *Biology and fertility of soils*, 51(3), 343-351.
102. Yung, L., Sirguey, C., Azou-Barré, A., & Blaudez, D. (2021). Natural Fungal Endophytes From *Noccaea caerulescens* Mediate Neutral to Positive Effects on Plant Biomass, Mineral Nutrition and Zn Phytoextraction. *Frontiers in microbiology*, 12, 689367.
103. Zavala-González, E. A., Lopez-Moya, F., Aranda-Martinez, A., Cruz-Valerio, M., Lopez-Llorca, L. V., & Ramírez-Lepe, M. (2016). Tolerance to chitosan by *Trichoderma* species is associated with low membrane fluidity. *Journal of basic microbiology*, 56(7), 792-800.

104. Zavala-Gonzalez, E., Escudero, N., Lopez-Moya, F., Aranda-Martinez, A., Exposito, A., Ricaño-Rodríguez, J., Naranjo-Ortiz M., Ramírez-Lepe M. & Lopez-Llorca, L. (2015). Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. *Annals of Applied Biology*, 166(3), 472-483.
105. Zhang, J., Fu, B., Lin, Q., Riley, I. T., Ding, S., Chen, L., Cui, J., Yang, L., & Li, H. (2020). Colonization of *Beauveria bassiana* 08F04 in root-zone soil and its biocontrol of cereal cyst nematode (*Heterodera filipjevi*). *PloS One*, 15(5), e0232770.