



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS

COMPATIBILIDAD DEL HONGO *Pochonia chlamydosporia* Y EXTRACTOS
VEGETALES PARA EL MANEJO INTEGRADO DE *Meloidogyne incognita* EN
FRIJOL

TESIS

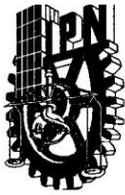
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN

MANEJO AGROECOLÓGICO DE PLAGAS Y ENFERMEDADES
PRESENTA

KATHIA VILCHIS MARTÍNEZ



YAUTEPEC, MORELOS, DICIEMBRE DE 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec, Morelos siendo las 11 horas del día 07 del mes de Octubre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada

por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CEPROBI

para examinar la tesis titulada:

Compatibilidad del hongo *Pochonia chlamydosporia* y extractos vegetales para el manejo integrado de *Meloidogyne incognita* en frijol

Presentada por el alumno:

Vilchis

Apellido paterno

Martínez

Apellido materno

Kathia

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	3	3	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

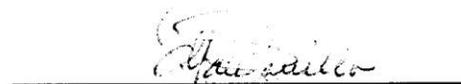
Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades

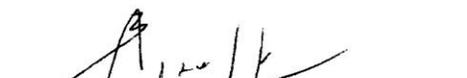
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

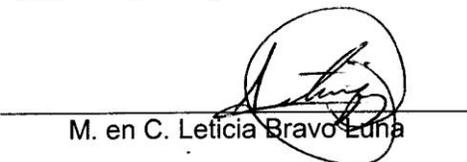
Directores de tesis


Dr. Roberto Montes Belmont


Dra. Rosa Heléna Manzanilla López


Dr. Angel René Arzuffi Barrera


Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez


M. en C. Leticia Bravo Luña


Dr. Federico Castrejón Ayala

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio



SEP IPN
CENTRO DE DESARROLLO
DE PRODUCTOS BIOTICOS
YAUTEPEC, MOR.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Yauatepec, Mor. siendo el día 28 del mes de Octubre del año 2011, el que suscribe Kathia Vilchis Martínez, alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades, con número de registro B091332, adscrito al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Roberto Montes Belmont y la Dra. Rosa Helena Manzanilla López y cede los derechos del trabajo intitulado Compatibilidad del hongo *Pochonia chlamydosporia* y extractos vegetales para el manejo integrado de *Meloidogyne incognita* en frijol, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deberán reproducir el contenido textual, gráficas, o datos del trabajo, sin el permiso expreso del autor y/o director (es) del trabajo. Este puede obtenerse escribiendo a la siguiente dirección: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yauatepec-Jojutla, Km 6.0, Calle CeProBi No.8, Col. San Isidro, C.P. 62731 Yauatepec, Morelos, México, Fax: (52) (01) (55) 57296000 ext. 82512 ó 01-7353941896, e-mail: ceprobi@ipn.mx (<http://www.ceprobi.ipn.mx>). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Kathia Vilchis Martínez

Nombre y firma

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis “Compatibilidad del hongo *Pochonia chlamydosporia* y extractos vegetales para el manejo integrado de *Meloidogyne incognita* en frijol” es responsabilidad del Dr. Roberto Montes Belmont, la Dra. Rosa Helena Manzanilla López y la Ing. Kathia Vilchis Martínez, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos a 28 de Octubre del 2011

ATENTAMENTE



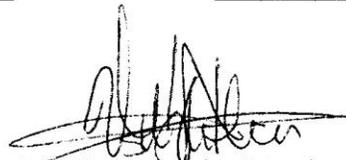
Dr. Roberto Montes Belmont

Nombre y firma
Director de tesis



Dra. Rosa Helena Manzanilla López

Nombre y firma
Directora de tesis



Ing. Kathia Vilchis Martínez

Alumno

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Interacciones planta-insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Roberto Montes Belmont y la Dra. Rosa Helena Manzanilla López en el laboratorio de Nematología en Rothamsted, Research bajo su supervisión. Para la realización de los estudios se contó con el apoyo económico de CONACyT (230988) y del Programa Institucional de Formación de Investigadores de la Secretaría de investigación y Posgrado (SIP) del IPN. La investigación fue realizada con los financiamientos otorgados al los proyectos de la SIP No. 20100701 y 20111131.

Agradezco a:

Dr. Roberto Montes Belmont por su dirección y apoyo para la realización de este trabajo.

La Dra. Rosa Helena Manzanilla López por enseñarme la importancia de la atención a los pequeños detalles para lograr un trabajo de calidad, además del gran esfuerzo realizado para brindarme las facilidades de realizar una estancia especial de investigación en Rothamsted, Research en el Reino Unido.

Todos mis profesores y compañeros de esta maestría.

La Dra. Rosa Navarrete Nava por impulsarme y ponerme en el camino para la realización de esta Maestría.

El M. en C. Francisco Franco Navarro por haberme iniciado en el estudio de este hongo y además proporcionarme lo necesario para trabajar con él en este trabajo.

El Dr. Francisco Perdomo Roldan por apoyarme y transmitirme su valioso tiempo y conocimiento.

Mis amigas Olga, Lilitiana, Adriana, Arely, Rosa, Ivonne, Lety, Nadia y mi amigo Jesús por su apoyo comprensión en los momentos difíciles.

Mi esposo Manuel, por su gran apoyo en la realización de la parte experimental de este trabajo y evitar poner en riesgo mi salud y la de mi bebé.

Mi hija Citlalli, por su comprensión cuando no pude estar con ella y se tuvo que conformar con saber que la amo con todo mi corazón.

Mi pequeña Nikté por aguantar tanto ajeteo dentro de mi panza y permitirme terminar con éxito este trabajo.

Mi padre David por soportar mis momentos de neurosis cuando las cosas se pusieron difíciles.

Mi hermano Oscar por escucharme y regalarme esos momentos de humor tan agrio y divertido.

Pero sobre todo a mi madre Guille por sus grandes e innumerables esfuerzos para ayudarme a cumplir mis objetivos.

Dedicado a:

Mis dos grandes amores: Citlalli y Nikté, porque sus sonrisas y logros me impulsan a seguir luchando para darme la oportunidad de darles una mamá de la que se puedan sentir orgullosas.

Mis padres, que me han enseñado que el amor de la familia es el mejor combustible para recorrer el apasionante camino de la vida.

CONTENIDO

CAPITULO	Páj.
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE CUADROS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Cultivo de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	3
2.1.1 Producción de frijol en México	3
2.1.2 Problemas fitosanitarios del cultivo de frijol	4
2.1.3 Enfermedades del frijol ocasionadas por nematodos	4
2.2 <i>Meloidogyne</i> spp.	5
2.2.1 Biología y distribución de <i>Meloidogyne</i> spp	5
2.2.2 Importancia económica	7
2.3 Hongos nematófagos	8
2.4 <i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> (Goddard) Zare y Gams 2001	9
2.4.1 Uso de <i>P. chlamydosporia</i> para control de nematodos agalladores	12
2.4.2 <i>P. c.</i> var. <i>chlamydosporia</i> para control de <i>Meloidogyne</i> spp.	14
2.5 Extractos vegetales para el control de nematodos	15
2.5.1 Coevolución planta-nematodo	15
2.5.2 Efecto de los metabolitos de las plantas sobre los nematodos	15
2.5.3 Manejo de plantas contra <i>Meloidogyne</i> spp.	20
3 JUSTIFICACIÓN	23
4 OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general.	24
4.1.1 Objetivos particulares	24
5 METODOLOGÍA	25
5.1 Identificación de la especie de <i>Meloidogyne</i>	25

5.2	Origen e incremento de la población de <i>Meloidogyne incognita</i>	25
5.3	Origen, mantenimiento y producción de <i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	27
5.4	Colecta de plantas con propiedades contra nematodos	27
5.5	Efecto de polvos vegetales sobre la emergencia y el desarrollo de Plántulas de frijol	29
5.6	Efecto de los extractos vegetales acuosos sobre el crecimiento micelial y la producción de clamidosporas de <i>P. c.</i> var. <i>chlamydosporia</i>	29
5.6.1	Producción de clamidosporas de dos aislamientos de <i>P. c.</i> var. <i>chlamydosporia</i> en presencia de cinco extractos vegetales acuosos	30
5.7	Efecto de los extractos vegetales acuosos sobre la movilidad de juveniles de segundo estadio de <i>Meloidogyne incognita</i> .	32
5.8	Parasitismo de huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> por <i>P. c.</i> var. <i>chlamydosporia</i> en presencia de extractos vegetales acuosos en medio sólido	33
5.8.1	Parasitismo de huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> por <i>P. c.</i> var. <i>chlamydosporia</i> en presencia de extractos vegetales acuosos en medio nutritivo líquido	34
5.8.2	Parasitismo de <i>Pochonia c.</i> var. <i>chlamydosporia</i> sobre huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> en presencia de los extractos vegetales acuosos en suelo	35
5.9	Efecto de polvos vegetales nematicidas solos y en combinación <i>P. c.</i> var. <i>chlamydosporia</i> sobre plantas de frijol establecidas en suelo infestado con <i>Meloidogyne incognita</i>	36
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6.1	Identificación de la especie de <i>Meloidogyne</i>	38
6.2	Efecto de los polvos vegetales sobre la emergencia y desarrollo de plántulas de frijol	40
6.3	Efecto de los extractos vegetales acuosos sobre la tasa de crecimiento micelial y la producción de clamidosporas de <i>P. c.</i> var. <i>chlamydosporia</i>	42

6.3.1	Producción de clamidosporas de dos aislamientos de <i>P. c. var. chlamydosporia</i> en presencia de cinco extractos vegetales acuosos	46
6.4	Efecto de los extractos vegetales acuosos sobre la movilidad de juveniles de segundo estadio de <i>Meloidogyne incognita</i>	49
6.5	Parasitismo de huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> por <i>P. c. var. chlamydosporia</i> en presencia de extractos vegetales acuosos en medio sólido	53
6.5.1	Porcentaje de parasitismo de huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> por <i>P. c. var. chlamydosporia</i> en presencia de extractos vegetales acuosos en medio nutritivo líquido	56
6.5.2	Porcentaje de parasitismo de <i>P. c. var. chlamydosporia</i> sobre huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> en presencia de los extractos vegetales acuosos en suelo	58
6.6	Efecto de polvos seleccionados solos y en combinación con <i>P. c. var. chlamydosporia</i> sobre plantas de frijol establecidas en suelo infestado con <i>Meloidogyne incognita</i>	60
7	CONCLUSIONES	65
8	PERSPECTIVAS	67
9	LITERATURA CITADA	68
	ANEXOS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Raíz agallada por <i>Meloidogyne incognita</i> proveniente del municipio de Xochitepec, Morelos	26
2. Corte de patrón perineal de <i>Meloidogyne incognita</i> de un ejemplar proveniente de la población de estudio.	38
3. Tercio anterior del cuerpo de hembra de <i>Meloidogyne incognita</i> de un ejemplar proveniente de población de estudio.	39
4. Agallas en raíz de frijol parasitada por <i>M. incognita</i>	39
5. Media (\pm DE) del crecimiento micelial diario (mm) de <i>Pochonia c. var. chlamydosporia</i> en presencia de extractos vegetales acuosos	44
6. Media (\pm DE) de la producción de clamidosporas de <i>Pochonia chlamydosporia var. chlamydosporia</i> en presencia de extractos vegetales acuosos	45
7. Media (\pm DE) de la producción de clamidosporas del aislamiento Pc341 DE= desviación estándar.	48
8. Media (\pm DE) de la producción de clamidosporas del aislamiento Pc10.	48
9. Efecto nematocida de extractos vegetales acuosos sobre la movilidad de juveniles de segundo estadio de <i>Meloidogyne incognita</i> .	51
10. Media del porcentaje de parasitismo de huevos de <i>M. incognita</i> en presencia de extractos vegetales acuosos.	54
11. Media del porcentaje de parasitismo de huevos de <i>P. c. var. chlamydosporia</i> aislamientos Pc341 y Pc10 sobre huevos de <i>M. incognita</i> en medio de extracto de levadura (EL).	57
12. Porcentaje de parasitismo de huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> por los aislamientos Pc10 y Pc341 de <i>Pochonia chlamydosporia var. chlamydosporia</i> en suelo estéril con extractos vegetales añadidos.	59
13. Medianas del Índice de agallamiento por efecto de la incorporación de polvos vegetales y <i>Pochonia chlamydosporia var. chlamydosporia</i> .	62

ÍNDICE DE CUADROS

1. Plantas con propiedades contra nematodos colectadas e identificadas en el estado de Morelos.	28
2. Efecto de extractos acuosos con propiedades contra nematodos en el desarrollo de plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	40
3. Media de la concentración de clamidosporas de <i>P. c. var. chlamydosporia</i> en presencia de extractos vegetales acuosos.	47
4. Media del porcentaje de J2 móviles de <i>Meloidogyne incognita</i> por la adición de 22 extractos vegetales acuosos, en cinco diferentes tiempos.	50

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la posibilidad de combinar la aplicación del hongo *Pochonia chlamydosporia* y extractos vegetales para el manejo integrado del *Meloidogyne* sp. en el cultivo de frijol. La población de *Meloidogyne* utilizada fue identificada como *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. Se seleccionaron, identificaron y colectaron 22 plantas con propiedades contra nematodos de fácil acceso en la región de estudio, las cuales se secaron a la sombra y finalmente se pulverizaron para su almacenamiento. Se evaluó a nivel invernadero el efecto de cada polvo vegetal sobre la emergencia y vigor de plantas de frijol para descartar posible fitotoxicidad. No se encontraron diferencias estadísticas se descartó efecto fitotóxico. Se añadió extracto vegetal de cada una de las plantas en medio de cultivo para evaluar el desarrollo de *Pochonia chlamydosporia* en presencia de éstos, se observó que la producción de clamidosporas es estimulada, siendo *Datura stramonium* el tratamiento que estimuló en mayor medida el desarrollo del hongo seguido de *Chenopodium album* y *Raphanus raphanistrum*. Sólo los tratamientos con *Calendula officinalis* y *Chenopodium ambrosioides* afectaron el desarrollo micelial. También se evaluó en laboratorio el efecto de extractos acuosos de cada una de las plantas sobre la movilidad de juveniles de segundo estadio (J2). Los resultados mostraron :efecto nematicida constante: *Chenopodium ambrosioides*, *Ch. album*, *Thymus vulgaris*, *Raphanus raphanistrum* y *Calendula oficinalis*. Otro factor a medir fue la influencia de extractos vegetales sobre el porcentaje de parasitismo de huevos del nematodo por *P. chlamydosporia*; el cual en medio sólido no se vio afectado con los extractos de *Ch. album*, *Nerium oleander* y *Tagetes lucida*; en medio nutritivo líquido las plantas evaluadas lo disminuyeron y en suelo estéril el porcentaje de parasitismo aumento. Finalmente, se probaron a nivel invernadero los tres mejores tratamientos obtenidos en los ensayos anteriores, combinándolos con *P. chlamydosporia*. El tratamiento combinado de *Ch. album*, *R. raphanistrum* y *T. vulgaris* más *P. chlamydosporia* tuvo el mismo efecto que el nematicida carbofuran fueron los mejores tratamientos.

ABSTRACT.

The aim of this work was to evaluate the possibility of combining the application of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and plant extracts for the integrated management of *Meloidogyne* sp. in the production of beans. A population of *Meloidogyne* was identified as *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. Was selected and identified 22 plants with antagonistic properties to nematodes accessible in the study region, which were dried in the shade and then ground for storage. Was evaluated the effect of each plant powder on the emergence and vigour of bean plants to discard phytotoxicity. No statistical differences were found between treatments, so it was discarded a phytotoxic effect. Aqueous plant extracts were added to PDA media for evaluate the mycelial growth and chlamydospore production of *P. chlamydosporia*. Results showed that in the production of chlamydospores is stimulated when *Datura stramonium* was the best treatment followed by *Chenopodium album* and *Raphanus raphanistrum*. None of the extracts affected the mycelial development based on perennial patterns of mature females. Also a bioassay was made in laboratory to know the effect of all aqueous plant extract on *M. incognita* second-stage juveniles (J2). The results showed constant nematicidal effect in: *Chenopodium ambrosioides*, *Ch. album*, *Thymus vulgaris*, *Calendula officinalis* and *Raphanus raphanistrum*. Another factor to be measured was the influence of plant extracts on nematode eggs parasitism percent by *P. chlamydosporia*. In solid medium *Ch. album* *Nerium oleander* and *Tagetes lucida* was not affected; in liquid medium all plants decreased and sterile soil was increased this parameter. Finally three of the best treatments from previous bioassays were combined with *P. chlamydosporia* in a glasshouse experiment. Results showed that the mixture of *Chenopodium album*, *Raphanus raphanistrum*, *Thymus vulgaris* and *P. chlamydosporia*. This treatment had the same result as the nematicide carbofuran on reducing the gall index.

1. INTRODUCCIÓN

El nematodo agallador *Meloidogyne spp* (Göldi, 1887) está distribuido en todo el mundo y cuenta con un amplio número de hospedantes (Moens *et al.*, 2009). Sasser y Carter (1985) estimaron que se pierde el 5% de la producción agrícola global por este nematodo.

En México se distribuye en gran parte del territorio nacional (Cid del Prado *et al.*, 2001) En el estado de Morelos, la especie predominante es *M. incognita* en cultivo de cacahuate (*Arachis hypogaea*), papaya (*Carica papaya*), sandía (*Citrullus lanatus*), calabaza (*Cucurbita pepo*), jitomate (*Lycopersicon esculentum*), plátano (*Musa sapientum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*) y tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) además de *M. arenaria* en jitomate y cacahuate (Montes-Belmont, 2000).; *Meloidogyne incognita* se combate principalmente mediante la desinfestación del suelo y el uso de nematicidas (Santoro *et al.*, 1998). Se ha encontrado que con esta especie con la aplicación de nematicidas en jitomate se logran incrementos de hasta 13 toneladas por hectárea en campos altamente infestados (Palacios y Sosa-Moss, 1970; Montes-Belmont, 2000). El género *Phaseolus* es también uno de sus hospedantes provocando en este pérdidas importantes por unidad de superficie (López, 1990).

Para su control, de acuerdo a entrevistas directas a los productores en Morelos, se recurre al uso de nematicidas químicos (Flores-Camacho *et al.*, 2008), sin embargo, su costo es elevado y actualmente sujeto a restricciones de tipo ambiental.

Por otro lado, dada la necesidad de atender los requisitos cada vez más estrictos sobre la inocuidad alimentaria por parte de los consumidores y exportadores, se requiere implementar alternativas de control compatibles con el ambiente y la sanidad del agroecosistema. Un ejemplo de este tipo de alternativas es el control biológico,

Pochonia chlamydosporia [= *Verticillium chlamydosporium* (Goddard), Zare, Evans & Gams], es un hongo nematófago, parásito facultativo de huevos de nematodos y de otros invertebrados y un hongo que habita naturalmente en suelos supresivos (Kerry, 1995).

Frans *et al.* (2001), evaluaron el potencial de *P. chlamydosporia* como agente de control biológico bajo condiciones de invernadero en suelo infestado con *Meloidogyne arenaria*, logrando reducir a partir de la tercera generación la población de nematodos hasta en un 80%, posterior a la primera aplicación del hongo.

Otra de las alternativas para el control de nematodos es el uso de extractos vegetales partiendo de que algunas plantas tienen propiedades antimicrobiales y proporcionan una reducción efectiva en las poblaciones de nematodos fitoparásitos (Montes-Belmont y Flores-Moctezuma, 2011; Kokalis-Burelle y Rodríguez-Kábana, 2006) Teniendo información tanto del hongo *Pochonia chlamydosporia* como de extractos vegetales para el control de *Meloidogyne incognita*, en este trabajo se evaluó la posibilidad de combinar ambas estrategias de control para lograr su incorporación en un manejo integrado en el cultivo de frijol que ayude a combatir este nematodo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol, pertenece a la familia de las Leguminosas o Fabáceas. La planta puede llegar a medir de 50 a 70 cm de altura, cuenta con raíces bien desarrolladas y una principal pivotante, tallos delgados y débiles, cuadrangulares. Las semillas, son reniformes oblongas a ovals o redondeadas, poco comprimidas, color rojo, amarillo, café o negro. La temperatura ideal para el desarrollo de este cultivo oscila entre 10°C y 27°C. La planta es muy susceptible a condiciones extremas; exceso o falta de humedad, por tal razón debe sembrarse en suelos de textura ligera y bien drenados (DGAPE y AS, 2009).

2.1.1 Producción de frijol en México

El cultivo de frijol es de gran importancia en la economía rural. Es definido en la Ley de Desarrollo Rural Sustentable (LDRS, 2001) como un producto básico y estratégico para el desarrollo rural que se siembra en todas las regiones agrícolas.

Es también uno de los granos básicos de gran importancia en la dieta de la población mexicana debido a sus cualidades nutritivas, diversidad de variedades, distinguiéndose de otros cultivos por el contenido de proteína. En México existen más de 70 variedades de frijol, de las que se explotan alrededor de 20 mejoradas y 50 criollas; su clasificación es básicamente por colores: blancos, amarillos, claros, rosados, morados, negros y pintos (DGAPE y AS, 2009).

En el ciclo primavera-verano 2008 se sembraron en el país alrededor de 1, 319,320 ha, siendo los principales estados con mayor superficie sembrada: Zacatecas, Durango, San Luis Potosí, Chihuahua y Guanajuato, en orden descendente. Para el ciclo otoño-invierno del mismo año, se sembraron 259,461 ha. En ese mismo año se destaca a Sinaloa con una superficie de 95, 840 has, seguida de Nayarit, Chiapas, Veracruz y Oaxaca (SIAP, 2008).

2.1.2 Problemas fitosanitarios del cultivo de frijol

El cultivo de frijol puede ser atacado por un complejo de insectos; sin embargo, los que ocasionan mayores daños son: la conchuela del frijol (*Epilachna varivestis* Mulsant), minador de la hoja (*Xenochalepus signaticollis* Baly) y gusano del fruto (*Heliothis zea* Fabr.) (Cardona *et al.*, 1982). También son importantes las enfermedades como la antracnosis [*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara 1889], la roya del frijol [*Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* (Pers.) Unger] y las pudriciones de la raíz causadas por *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. 1881 y *F. oxysporum* Schltdl. 1824 (Mena y Velázquez, 2010); sin embargo, se han detectado cada vez con mayor frecuencia plantas enfermas con síntomas característicos de ataque por nematodos (Varón de Agudelo *et al.*, 1982).

Se ha reportado también la diseminación de los nematodos *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen, y *Meloidogyne spp.* en diversos estados de la república (Velásquez, 2001) provocando pérdidas que van de un 18 a 36% en la producción (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010).

2.1.3 Enfermedades del frijol ocasionadas por nematodos.

En la literatura se han descrito diferentes géneros de nematodos que atacan al frijol, entre ellos: *Trichodorus* Cobb 1913, *Pratylenchus* Filipjev, 1936, *Belonolaimus* Steiner, 1949, *Heterodera* Schmidt, 1871, *Ditylenchus* Filipjev, 1936 y *Meloidogyne* (Cardona *et al.*, 1982).

Se ha reportado la presencia del nematodo foliar *Aphelenchoides besseyi* Christie como causante de manchas necróticas en la hoja del frijol, principalmente en áreas de alta humedad y zonas de la planta abrigadas por la sombra de la hojas superiores o malezas (Salas y Vargas, 1984).

Las especies del género *Pratylenchus* asociadas al frijol son: *P. brachyurus*, *P. penetrans* (Cobb, 1917) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 además de *P. scribneri* Steiner 1943. Por el tipo de daño que presentan las plantas afectadas, reciben el nombre de nematodos de lesiones radicales. Los nematodos de este

género causan lesiones de color café o negro al alimentarse de los tejidos epidérmicos y corticales de las raíces jóvenes, las cuales posteriormente pueden ser fácilmente atacadas por otros patógenos (Varón de Agudelo *et al.*, 1982).

En el año 1991 se reportó la presencia del nematodo ‘falso nodulador’ *Nacobbus aberrans* afectando al cultivo de frijol (cv. criollo flor de mayo) bajo condiciones de riego en el estado de Zacatecas (Velázquez y González, 1991). Durante los años de 1998 al 2000 se realizaron diversos recorridos en los estados de San Luis Potosí, Aguascalientes y Zacatecas tanto en zonas de riego como de temporal en donde se confirmó su presencia (Velásquez, 2001). Este nematodo provoca daños a la planta al provocar la aparición de agallas en forma de rosario en la raíz del cultivo. También se reportaron la introducción y establecimiento de *N. aberrans* (población Chapingo en el Estado de México en los cultivares de frijol azufrado, canario, flor de mayo, negro ejotero, negro Jamapa y negro Querétaro (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). Las pérdidas a la producción en frijol ascienden a un 36% (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

2.2 *Meloidogyne* spp.

Este género y sus especies es cosmopolita y parásito de muchas especies de plantas; tiene un rápido desarrollo y reproducción durante el ciclo del cultivo, lo que lo hace un nematodo que provoca graves daños. La hembra al alimentarse induce deformaciones típicas en la raíz llamadas agallas o nódulos debido a la modificación y crecimiento anormal de las células radicales (células gigantes), provocando diferentes grados de retraso en el crecimiento, pérdida del vigor de la planta, además el tejido infectado es más susceptible de infección por otros patógenos (Perry *et al.*, 2009).

2.2.1 Biología y distribución.

El nematodo agallador *Meloidogyne* spp. está distribuido en todo el mundo, aunque ocurre con mayor frecuencia y abundancia en regiones con clima cálido y tórrido e

inviernos cortos y moderados. Con respecto a sus requerimientos climáticos estos nematodos pueden ser agrupados en dos grupos: termófilos y criófilos dependiendo de su capacidad para sobrevivir y desarrollarse, considerando su temperatura basal de 10°C y a partir de la cual pueden completar su ciclo biológico (Lyons *et al.*, 1975). *Meloidogyne hapla* es criófila y tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas por debajo a los 10°C, a diferencia de *M. arenaria* y *M. javanica* que son termófilas y no sobreviven a temperaturas por debajo de los 10°C además de ser especies cuya eclosión es determinada principalmente por la temperatura (Curtis *et al.*, 2009).

La mayoría de los trabajos del género *Meloidogyne* se centra en cuatro especies, tres que son consideradas de clima tropical: *M. arenaria*, *M. incognita*, y *M. javanica* y una cuarta, *M. hapla*, de clima templado. La gran gama de hospederos de cada una de las especies y su amplia distribución contribuyen al reconocimiento de su importancia (Moens *et al.*, 2009).

Diversas familias vegetales albergan a este nematodo, algunas además de ser parasitadas por diferentes especies de *Meloidogyne* son plantas de gran importancia agrícola tales como: solanáceas, cucurbitáceas y leguminosas entre otras (Montes-Belmont, 2000). El género *Phaseolus* está reportado como un cultivo en el que *Meloidogyne* provoca bajos rendimientos por unidad de superficie (López, 1990).

En México, *Meloidogyne spp.* se distribuye en gran parte del territorio nacional (Cid del Prado *et al.*, 2001), debido a su amplio rango de hospedantes y a la diversidad de cultivos en nuestro país. Las principales especies que atacan a cultivos y algunas malezas en el territorio nacional son: *M. hapla*, presente en el Distrito Federal, y los estados de México, Guerrero, Guanajuato, Jalisco, León, Nayarit Puebla y Zacatecas en cultivos como cresta de gallo (*Celosia argentea* L.), crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Hemsl), chinito (*Impatiens balsamina* L.), epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.), fresa (*Fragraria spp.*), jitomate (*S. esculentum*), lechuga (*Lactuca sativa* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), pino (*Pinus hartwegii* Lindt), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y zanahoria (*Daucus carota* L.); *M. incognita* en los estados de Baja California Norte, Colima, Chiapas, Durango, Estado de México, Guerrero, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala y

Veracruz en cultivos como algodón (*Gossypium hirsutum* L.), cacahuete (*Arachis hipogea* L.), cafeto (*Coffea arabica* L.), calabaza (*Cucurbita pepo*), chayote (*Sechium edule* (Lacq) Swl), chile (*Capsicum annuum* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris*), garbanzo (*Cicer arietinum* L.), jitomate (*Lycopersicon esculentum*), maíz (*Zea mays* L.), melón (*Cucumis melo* L.), papa (*S. tuberosum* L.), papaya (*Carica papaya* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), plátano (*Musa* spp.), sandía (*Citrullus vulgaris* Schard), tabaco (*N. tabacum* L.), tomate de cascara (*Physalis* spp.), vid (*Vitis vinífera*) y violeta africana (*Saintpaulia* spp.). Otra especie importante en nuestro país es *M. javanica* en el Estado de México, Colima, Morelos, Nayarit Tlaxcala y Veracruz, en cultivos como cacahuete (*A. hipogea*), cafeto (*C. arabica*), clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), jitomate (*S. esculentum* L.), tabaco (*N. tabacum*) y yerbabuena (*Mentha spicata* L.) (Montes-Belmont, 2000).

Es importante destacar para fines de este trabajo que *Meloidogyne* spp. ha sido registrado en los Municipios de Atlatlahucan 18° 56' lat. N y 98° 54' long. O, Tlayacapan 18° 57' lat N 98° 59' long O, Totolapan 18°58' lat N 98°55' long O y Yecapixtla 18° 53' lat N 98° 52' lat O, del estado de Morelos, en los que se localizó en cultivo de jitomate (*S. esculentum*), aunque no son los únicos municipios del estado en los que se presenta este patógeno.

2.2.2 Importancia económica

Los daños y pérdidas ocasionados por *Meloidogyne* spp., al igual que la mayoría de los nematodo fitoparásitos se incrementa en regiones con clima tropical debido a que se incrementa la diversidad de los patógenos; las condiciones para la colonización, desarrollo, reproducción y dispersión se ven favorecidas, además la falta de recursos humanos y financieros para el manejo de los cultivos incrementa el problema (De Weale y Elsen, 2007 en Moens *et al.*, 2009).

La severidad de los daños por este nematodo pueden variar con su especificidad hospedatoria, la rotación de los cultivos y el tipo de suelo (Moens *et al.*, 2009).

Así también el umbral económico depende de los factores antes mencionados. El umbral económico ha sido determinado en algunos cultivos y puede variar desde

aproximadamente 0.5-2 juveniles de segundo estadio g^{-1} de suelo o 1000 individuos por 500 cm^3 (Greco y Di Vito, 2009).

Además de los costos directos provocados por el nematodo hay que considerar aquéllos por el estatus de organismo cuarentenado de algunas especies de *Meloidogyne* en algunas regiones del mundo (Moens *et al.*, 2009).

2.3 Hongos nematófagos

Se conocen alrededor de 170 especies en grupos taxonómicos muy diversos de hongos nematófagos llamados así por su capacidad de matar y consumir a nematodos mediante diferentes mecanismos ya sea como predadores, parasitoides de nematodos vermiformes o bien parasitando quistes o huevos (Hans-Börje, 1985).

Los hongos predadores atrapan a sus presas por medio de estructuras adhesivas (*Arthrobotris olygospora* Fresenius), ramificaciones adhesivas del micelio (*Monacrosporium cionopagum* (Drechsler) Subram. 1964), anillos constrictivos (*Dactylaria brochopaga* Dreschler, *A. anchonia* Drechsler) y no constrictivos (*Dactylaria candida* (Nees) Sacc. 1886) (Barron, 1977). Todos estos organismos son saprofitos que tienen la capacidad de alimentarse de nematodos y utilizarlos como una fuente adicional de energía, encontrándose más de un tipo de estas estructuras en diferentes especies de un mismo género.

Los nematodos que son presa de este grupo de hongos suelen quedar adheridos al micelio o estructura especializada según sea el caso, para posteriormente penetrar sus hifas por su cutícula hasta la cavidad corporal y formar un bulbo infectivo que sirve para absorber el contenido corporal. El nematodo muere y de su cadáver emergen hifas que esporulan o producirán estructuras especializadas.

La sustancia adhesiva en conidias y otras estructuras involucradas en el proceso de infección del nematodo está constituida por compuestos del tipo lecitina que se adhiere con sacáridos específicos a la cutícula del nematodos; suele permanecer libre de partículas de suelo y materia orgánica (Barron, 1977).

Respecto a los organismos endoparásitos o parásitos de huevos y quistes, éstos dependen de los nematodos como principal fuente alimenticia y su densidad poblacional en el suelo está fuertemente ligada a la densidad poblacional de los nematodos (Deacon, 1997).

Los hongos endoparásitos no desarrollan micelio en forma extensiva fuera del huésped, presentan estados de resistencia cuya función es la diseminación y la supervivencia bajo condiciones adversas, un ejemplo es *Catenaria anguillulae* Sorokin, en el cual las esporas flageladas se mueven siguiendo un gradiente químico originado por las secreciones del nematodo.

Otro grupo de hongos lo conforman aquellos que presentan conidias adhesivas como es el caso de *Meritacrum spp.*, *Meria spp.*, *Cephalosporium spp.*, y *Pochonia spp.*, siendo este último uno de los hongos que han mostrado facilidad para cultivarse en laboratorio (Deacon, 1997).

2.4 *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams 2001.

Pochonia chlamydosporia es clasificado en la División Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales, Familia Clavicipitaceae y su teleomorfo está en el género *Cordyceps*, especie *Cordyceps chlamydosporia*.

Es un hongo saprofita, parásito facultativo de huevos de nematodos, por lo que se considera un agente potencial en el control biológico de nematodos formadores de agallas (Hernández e Hidalgo-Díaz, 2008).

Pochonia es un género muy heterogéneo ya que se constituye de especies con hábitos saprofíticos, fitófagos, entomófagos, nematófagos y algunas especies que se alimentan de rotíferos, moluscos e inclusive de otros hongos. Zare y Gams en el año 2001 realizaron un estudio minucioso usando métodos clásicos y moleculares para agrupar a los organismos ubicados en este género en grupos más naturales. El estudio consistió en identificar agrupaciones o clados: el primero constituido por especies de hábitos fitoparásitos y saprofíticos con la capacidad de formar

conidióforos erectos; el segundo grupo se compone de especies formadoras de colonias con micelio de color claro y de apariencia algodonosa, sin presencia de clamidosporas y de hábitos entomófagos; el tercer grupo fue constituido por especies de hábito saprofito y conidios adhesivos con capacidad de parasitar nematodos; por último, el cuarto grupo fue definido por organismos saprofitos capaces de colonizar huevos y quistes de nematodos.

Basados en este estudio Zare y Gams (2001), propusieron nuevos géneros y retomaron otros que ya estaban en desuso, entre ellos *Pochonia*, un género conformado por parásitos de huevos y quistes de nematodos, con capacidad para formar clamidosporas típicas, de pared engrosada.

Los grupos señalados anteriormente, se sometieron a un análisis de cadenas cortas y largas del ADN, definiendo cuatro categorías fundamentales: en el Grupo A, especies de hábitos saprofitos y saprofitos que forman conidióforos erectos; el Grupo B, con especies que forman colonias de color claro y apariencia algodonosa sin presencia de clamidosporas, de hábitos entomófagos y fungícolas, el Grupo C abarca saprofitos con conidios adhesivos que pueden ser endoparásitos de nematodos; y finalmente el Grupo D en el cual se reunieron organismos saprofitos capaces de colonizar huevos y quistes de nematodos.

Se consideró entonces por primera vez a *P. chlamydosporia* Goddard (= *Verticillium chlamydosporium*) como parásito de quistes de nematodos después de aislar al hongo de huevos de *Heterodera schachtii* Schmidt (Frans *et al.*, 2001) y *H. avenae* Woll (Kerry, 1995, citado por Frans *et al.*, 2001).

La especie *Pochonia chlamydosporia* actualmente se divide al menos en dos variedades: *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* y *P. chlamydosporia* var. *catenulata* cuya principal diferencia consiste en los conidios, ya que esta última variedad forma pequeñas cadenas de conidios en la separación de las fiálides a diferencia de la variedad *chlamydosporia* en la cual sus grupos de esporas forman cabezuelas (Zare y Gams, 2001).

En medio de cultivo las colonias de *P. chlamydosporia*, generalmente alcanzan un diámetro de 15 a 40 cm en 10 días; se caracterizan también porque toman una coloración amarillenta cuando hay aparición de clamidosporas (Zare y Gams, 2001).

Las clamidosporas facilitan la vida del hongo cuando las poblaciones del nematodo son escasas, éstas aseguran su permanencia en el suelo. Es por eso que este fenómeno permite prolongar la vida del hongo en el suelo y facilita en el momento adecuado el parasitismo de los huevos del nematodo además de que no se afecta el desarrollo de las plantas. La extensión debida al crecimiento de las hifas es muy limitado, el mayor crecimiento ocurre en la rizósfera, su establecimiento en el suelo se facilita cuando el hongo se adiciona en forma de clamidosporas (De Leij y Kerry, 1991; Bourne *et al.*, 1994).

Sus conidióforos generalmente son postrados, es decir, el conidióforo es un tanto débil y solo erguido en el extremo, además es poco diferenciado del micelio, portan de 2 a 3 fiálides por nódulo en verticilo, aunque en ocasiones son sencillos. Los conidios son hialinos o de color brillante, unicelulares y crecen en cabezuelas cubiertas de una sustancia adhesiva, pueden agruparse en cabezuelas o cadenas, de subglobosas a elipsoidales, isodiamétricas o falcadas; producen dictioclamidosporas en el micelio aéreo (Zare y Gams, 2001).

El establecimiento del hongo en el suelo se facilita cuando se adiciona al suelo en forma de clamidosporas, ya que éstas tienen la cualidad de colonizar la rizosfera sin intervenir de forma negativa o afectar el desarrollo de la planta, esto permite prolongar la vida del hongo en el suelo y por tanto facilitar el parasitismo de agalladores y formadores de quistes (Bourne *et al.*, 1994).

Durante el proceso de infección *P. chlamydosporia* penetra la membrana de la superficie del huevo llamada corion, mediante la utilización de estructuras especializadas (apresorios), llevándose a cabo la desintegración de la capa vitelina del corion a consecuencia de la disolución enzimática, aunque no total de la quitina y algunos lípidos que conforman las distintas capas de la cáscara del huevo del nematodo.

Estudios realizados con microscopía electrónica mostraron el desarrollo de un apresorio el cual ayuda a facilitar la penetración del corion del huevo y da origen al bulbo de infección que da lugar a la formación de las redes de micelio que colonizan el huevo (Kerry y Bourne, 1996).

2.4.1 Uso de *P. chlamydosporia* para control de nematodos agalladores

Pochonia chlamydosporia es generalmente un parásito facultativo de nematodos en estadios sedentarios, está asociado a suelos supresivos a nematodos como un control natural de nematodos formadores de quistes y agalladores, por tanto es considerado como un agente potencial de control biológico aplicable a suelos infestados con nematodos.

Las estrategias de biocontrol incluyen la incorporación de *P. chlamydosporia* con otras acciones de control cultural que permitan reducir la dependencia de nematicidas para el desarrollo del cultivo. Bourne *et al.* (1994), realizaron pruebas con aislamientos obtenidos de suelo infestado por *Meloidogyne spp.* y *Heterodera spp.*, con el fin de determinar la capacidad de cada uno para colonizar la rizosfera en condiciones estériles y su habilidad parasítica en suelo no infestado. Sus resultados mostraron que entre aislamientos puede presentarse una gran variabilidad ya que un aislamiento, bajo condiciones estériles, no necesariamente se comporta igual en suelo infestado y no estéril; esto puede deberse a una débil capacidad del hongo para competir con el resto de la biota en el suelo. En sus bioensayos, el control de nematodos resultó más efectivo cuando las masas de huevos de *Meloidogyne spp.* se encontraban expuestas en la superficie de la raíz o embebidas en agallas pequeñas, así que como cuando el parasitismo se daba en etapas tempranas del desarrollo del huevo.

Cualquier aislamiento de *Pochonia chlamydosporia*, para ser considerado como un agente potencial de control biológico de nematodos fitopatógenos de importancia agrícola, debe reunir una serie de requisitos los cuales permiten seleccionar o discriminar entre aquellos poco efectivos y aquellos aislamientos que potencialmente pueden explotarse a mayor escala y de manera comercial. Las cinco etapas

mediante las cuales se selecciona a un aislamiento de *Pochonia chlamydosporia* antes de su uso a mayor escala se señalan a continuación (Bourne *et al.*, 1994).

1. Colecta de aislamientos. Consiste en la extracción del hongo, éste puede provenir del suelo o de huevos del nematodo, posteriormente se debe cultivar libre de cualquier organismo contaminante.
2. Evaluaciones en laboratorio. En este nivel se debe determinar el potencial de control biológico de cada aislamiento. En esta etapa se realizan pruebas de colonización de raíces, parasitismo en huevos y la capacidad de producir clamidosporas en el sustrato de crecimiento seleccionado.
3. Determinación de las condiciones óptimas para la producción masiva de clamidosporas, para lograrlo se pueden realizar pruebas de producción masiva en diferentes sustratos bajo condiciones estériles.
4. Evaluación de los aislamientos bajo condiciones de invernadero y determinación de los factores que pudieran limitar su eficiencia en el control de nematodos. Los aislamientos son probados en el invernadero en diversas plantas con diferentes grados de infestación así como del hongo, todo bajo condiciones no estériles, lo más cercano a las condiciones que hay en campo.
5. Evaluación de la eficiencia de los aislamientos en campo. Se aplican los tratamientos con la dosis, aislamientos efectivos, etc., con mejores resultados en la etapa de invernadero, para que, combinadas con otras estrategias se constituya un manejo integral del patosistema. Bajo estas condiciones son importantes los monitoreos del hongo a los intervalos de tiempo previamente establecidos.

Considerando la información anterior, a finales de los años noventa se inició la búsqueda de aislamientos nativos del hongo en México para evaluar su potencial parasítico contra *Nacobbus aberrans* y subsecuentemente de otros nematodos agalladores (Flores-Camacho *et al.*, 2001), logrando la obtención de cinco cepas con alto potencial de control biológico.

Posteriormente Franco-Navarro *et al.* (2009) detectaron la presencia de aislamientos nativos de *P. chlamydosporia* en ambientes naturales: bosque natural, bosque secundario, pastizal y maizal, todos ellos dentro de la Reserva de La Biosfera “Los

Tuxtlas” (Veracruz, México); además se registró por primera vez la presencia de *P. c. var. catenulata* en México. En 19 de los aislamientos se obtuvieron porcentajes de parasitismo de huevos de *Nacobbus aberrans* superiores al 70%, así como la colonización de raíz en maíz superior al 75%.

En el presente trabajo nos referiremos a la variedad *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* como *P. c. var. chlamydosporia* o simplemente como *P. chlamydosporia*.

2.4.2 *P. c. var. chlamydosporia* para el control de *Meloidogyne* spp.

En 1996, Kerry y Bourne estudiaron la biología y ecología del hongo, determinando la importancia de la interacción del hongo con la planta de tomate parasitada por el nematodo *Meloidogyne incognita* en una interacción tritrófica (*i.e.*, planta-nematodo-hongo) para una eficiente explotación del hongo como agente de control biológico.

En el año 2000, Hidalgo-Díaz *et al.*, aislaron al hongo a partir de suelo proveniente de plantaciones de café. Durante el proceso de selección, plantas de jitomate fueron infectadas en invernadero para la selección de aislamientos. Los aislamientos se clasificaron por diferencias morfológicas, agrupándolos por variedades: *V. chlamydosporium* var. *chlamydosporia*, *V. c. var. catenulatum*, *V. c. var. psalliotae*, *V. suchlasporium* y un aislamiento de *V. chlamydosporium* var. *chlamydosporium* con un largo inusual de la dictioclamidosporas, siendo los aislamientos de *V. chlamydosporium* var. *catenulata* los que produjeron las cifras más altas en cuanto a parasitismo de huevos de *Meloidogyne* spp., colonización de raíces y producción de clamidosporas.

En el año de 2001, Frans y coautores, evaluaron el potencial como agente de control biológico de tres aislamientos de *P. chlamydosporia* en cultivo de jitomate bajo condiciones de invernadero y suelo infestado con *Meloidogyne arenaria*. El trabajo efectuado en las provincias Ciudad de La Habana y La Habana, en la que se presentan importantes pérdidas por *Meloidogyne* sp.. El hongo, ya como un producto producido de forma masiva, se aplicó en áreas afectadas mezclándolo en proporción 1:10 partes (peso: peso) con humus de lombriz producido a partir de estiércol

vacuno, dentro de una secuencia de rotación de cultivos (habichuela – acelga – tomate). Al terminar el ciclo del cultivo del jitomate. Seis meses después de la aplicación se obtuvo un 70% de colonización de masas de huevos presentes en las raíces; además se logró reducir la población de juveniles de segundo estadio (J2) de los nematodos (*Meloidogyne incognita*) en el suelo de forma significativa con un 68% en el primer ciclo y un 84% en el segundo ciclo del cultivo (Hernández e Hidalgo-Díaz, 2008).

2.5 Extractos vegetales para el control de nematodos

2.5.1 Coevolución planta-nematodo

De acuerdo a evidencias paleontológicas tanto las plantas vasculares como los nematodos tienen centenas de millones de años existiendo en nuestro planeta (Poinar *et al.*, 1994; Ayala, 2006), por lo que la evolución paralela de estos organismos data desde entonces.

Hoy sabemos que con la aparición la agricultura y monocultivos se ha favorecido que algunos organismos adquieran caracteres epidémicos, incluyendo algunos nematodos, los cuales hemos tratado de regular con diversos métodos de control, Los nematodos fitopatógenos han desarrollado a lo largo de su historia diversos mecanismos de co-adaptación y co-evolución con sus hospedantes.

Por otra parte, han desarrollado mecanismos bioquímicos de defensa (Nelson, 1979). A través de su proceso co-evolutivo las interacciones bioquímicas planta-nematodo han llevado a una alta diversidad de compuestos aleloquímicos que tienen todo tipo de efectos: estimulantes o inhibidores de la oviposición, repelentes, atrayentes, nematicidas y/o nematostáticos.

2.5.2 Efecto de los metabolitos de las plantas sobre los nematodos

En cuanto a plantas con propiedades antimicrobianas, en la base de datos de Duke (2008) se menciona la estructura química de 2,396 especies de plantas, de las cuales 833 actúan contra nematodos que representan un 33% del total de plantas estudiadas. Según Duke (2008), las plantas antagónicas a los nematodos hasta

ahora conocidas, se encuentran agrupadas dentro de 25 familias de plantas superiores y también hay información sobre algas marinas (Chitwood, 2002).

Actualmente se sabe que las plantas están constituidas por diversos compuestos que bien pueden actuar de forma estimulante o antagonista con los nematodos y que diversos extractos de diferentes plantas con propiedades antihelmínticas o antimicrobianas son efectivos en la reducción de la población de nematodos fitoparásitos (Ferris y Zheng, 1999).

Es así como las plantas al ser atacadas por patógenos despliegan diferentes estrategias y mecanismos de defensa que pueden ser constitutivas (histológicas o químicas) o inducidas por factores externos (Verpoorte, 2000). Las constitutivas incluyen barreras físicas, procesos de lignificación, suberización y formación de calosas; también la formación de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas como parte de la estructura de los tejidos. Las defensas inducidas son un sistema complejo que parte desde una señal química o elicitador que desencadena la producción de enzimas del metabolismo secundario cuyo resultado final sería la síntesis de compuestos antimicrobianos, los cuales, afectan, además de a los patógenos, a los consumidores de las plantas y a sus enemigos naturales (Krischik y Denno, 1983; Langenheim, 1994).

Desde el punto de vista estructural los aleloquímicos contra nematodos son de muy diversa naturaleza, los más comunes son de bajo peso molecular pero también los hay de naturaleza proteica; los primeros pertenecen a las principales clases de compuestos secundarios: terpenoides, sesquiterpenos, saponinas, compuestos azufrados o nitrogenados (alcaloides, aminas, amidas), alifáticos (especialmente alcanos de cadena larga y ácidos grasos) y aromáticos (fenoles, flavonoides, estilbenos, bibenzilos, xantonas y benzoquinonas). Se sabe también que algunas de las fitoalexinas que tienen acción contra hongos también actúan contra nematodos (Chitwood, 2002).

Un gran número de compuestos llamados isoprenoides se forman por la condensación de cinco unidades de carbono. Entre los más simples encontramos a los terpenoides que frecuentemente son los componentes de los aceites esenciales

de las plantas y es muy común que posean actividad contra depredadores y agentes patógenos (Chiwood, 2002).

Algunos como el linalol de *Ocimum basilicum* L., el eugenol de *Eugenia caryophyllata* Thunb, el mentol de *Mentha piperita* L., el cineol y el geraniol de *Cymbopogon caesius* (Hook. & Arn.) Stapf actúan contra los juveniles de *Anguina tritici* Steinbuch) Gervais & Van Beneden, 1859, *Meloidogyne javanica*, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb 1914 y *Heterodera cajani* Koshi, 1967 (Malik *et al.*, 1987). La aplicación al suelo de citral de *Cymbopogon citratus* Stapf, geraniol y limoneno de *Citrus limon* Burm inhiben la reproducción de *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita* y *Heterodera schachtii* Schmidt (Bauske *et al.*, 1994; Osman y Viglierchio, 1988; Viglierchio y Wu, 1989). El citronelol aislado de *Pelargonium graveolens* L'Heritier se ha usado con buenos resultados en el tratamiento de plántulas de jitomate contra *Meloidogyne incognita* (Rao *et al.*, 1996). El timol de *Thymus vulgaris* L. tiene actividad nematocida contra *Meloidogyne* spp (Soler-Serratosa *et al.*, 1996). El citral ha dado buenos resultados para el control de *Meloidogyne* en algodón (Bauske *et al.*, 1994). Probando 26 monoterpénidos se encontró que el carvacrol y el timol tuvieron el mayor efecto sobre *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner et Buhner (Choi *et al.*, 2007). En un estudio en el que se comparó la actividad nematocida del geraniol y el citronelol se mostró que los alcoholes-monoterpénidos son más activos que los aldehídos-monoterpénidos contra *Anguina tritici* (Steinbuch, 1799) Chitwood, 1935, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, *H. avenae* y *M. javanica* (Sangwan *et al.*, 1993).

Dentro de los diterpenoides se ha encontrado con efecto contra *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 al compuesto odorocin extraído de *Daphne odora* F. Muell de la familia Thymelaceae; este aleloquímico consiste en un esqueleto diterpenoide unido a ácido benzoico (Kogiso *et al.*, 1976).

Los triterpenoides es un grupo de compuestos diversos entre los que se han encontrado aleloquímicos con propiedades contra nematodos. Las saponinas triterpenoides como los glicoalcaloides α -tomatina y la α -chaconina del jitomate son nematotóxicas. Otros aleloquímicos de este grupo se han aislado de *Bacopa monniera* L. (Scrophularaceae), *Lantana camara* Adans (Verbenaceae) y *Ocimum*

gratissimum L. (Lamiaceae) (Njoku *et al.*, 1997; Renukappa *et al.*, 1999). Otro grupo derivado de la condensación de moléculas de isopreno, los sesquiterpenoides también se han encontrado con propiedades contra nematodos como el hemogospol y el 6 metoxihemogospol aislados de variedades resistentes del algodón a *Meloidogyne incognita*; también está incluida en este grupo la alantolactona de *Inula helenium* L. (Asteraceae) que tiene propiedades antihelmínticas en mamíferos (Mahajan *et al.*, 1986). La fitoalexina solavetivona (que es un sesquiterpenoide) se ha demostrado que está genéticamente ligada a la resistencia en papa a *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Skarbilovich (Desjardins *et al.*, 1997). Otra fitoalexina de este mismo grupo la rishitina de la papa afecta la movilidad de *Ditylenchus destructor* Thorne (Zinovieva y Chalova, 1987). Los sesquiterpenos se sintetizan en respuesta a la infección por nematodos (Chiwood y Lusby, 1991). Se sabe que los sesquiterpenos bicíclicos risitina y lubimina aislados de plantas resistentes a *Ditylenchus destructor* tienen un efecto nemotostático en juveniles de *D. destructor* y *D. dipsaci* (Zinovieva y Chalova, 1987).

Los alcaloides son otro grupo de compuestos con actividad nematocida en donde destaca el sulfato de fisostigmina aislado de *Physostigma venenosum* Balf (Fabaceae) que protege a las plántulas de chícharo (*Pisum sativum* L.) contra *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev (Bijloo, 1965). Los alcaloides tetracíclicos de *Bocconia cordata* Willd (Papaveraceae) han resultado nematotóxicos contra nematodos de vida libre. Los alcaloides de *Sophora flavescens* Aiton (Fabaceae) tienen actividad nematocida contra *Bursaphelenchus xylophilus*. Las raíces de *Catharanthus roseus* Don tienen el alcaloide pentacíclico serpentina con acción nematocida además de inhibir la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* (Rao *et al.*, 1996).

Los ácidos grasos como componentes estructurales de las plantas tienen también un papel en la defensa contra el ataque de nematodos. El ácido butírico detectado en la cebada en descomposición actúa sobre *M. incognita* y *Pratylenchus penetrans* (Cobb, 1917) Chitwood & Oteifa, 1952 (Sayre *et al.*, 1965). Los ácidos palmítico, mirístico y oleico aislados de *Iris japonica* (Iridaceae) tiene principios nematocidas (Munakata, 1983). En *Argemone mexicana* se han encontrado triglicéridos que previenen la infección de *M. incognita* en jitomate (Saleh *et al.*, 1987). Alcoholes

derivados de ácidos grasos se han detectado con efecto contra nematodos en el frijol terciopelo *Mucuna aterrima* (Nogueira *et al.*, 1996).

Desde principios de siglo pasado se conoce que algunas plantas, durante su descomposición liberan compuestos que por acción enzimática de microorganismos se transforman en compuestos con propiedades fungicidas y nematicidas, tal es el caso de casi todas las especies de plantas de la familia Brassicaceae que a partir de sus glucosinolatos liberan los isotiocianatos como el alylisotiocianato de la mostaza [*Brassica nigra* (L.) W. D. J. Koch] que tiene acción contra el nematodo dorado de la papa *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Skarbilovich (Fahey *et al.*, 2001) o el 2-fenil-isotiocianato que suprime la reproducción de *Pratylenchus neglectus* Filipjev y Schuurmans-Stekhoven (Potter *et al.*, 1998). Algunas Poaceae como el sorgo y el pasto Sudan [*Sorghum sudanense* (Piper) Stapf] contienen el glicósido dhurrin que al hidrolizarse produce cianuro que actúa contra *Meloidogyne hapla* (Widmer y Abawi, 2000). La yuca (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae) contiene el glicósido linamarina; cuando los tubérculos son heridos también se libera cianuro, propiedad que en Brasil se ha usado para el control de nematodos agalladores (Senna y Ponte, 1982).

Así como los fenoles se han asociado a la resistencia a hongos e insectos también los fenoles se han asociado a la resistencia a los nematodos aún cuando son pocos los que se han aislado de raíces y probado su acción contra los nematodos como el pirocatecol aislado de *Eragrostis curvula* (Poaceae) (Schrader) Nees y probado con éxito contra *Meloidogyne* sp. (Scheffer *et al.*, 1962). También se ha logrado inhibir la infección por *Rotylenchulus reniformis* Linford and Oliveira en jitomate con cinco fenoles (pirocatecol, hidroquinona, floriglucinol, pirogalol y orcinol) (Mahmood y Siddiqui, 1993). Los fenoles derivados del procesamiento para obtener aceite de oliva como los ácidos vanilínico, cafeico, siringico y o-cumárico fueron efectivos para inhibir a *Meloidogyne javanica*. En tanto que el benzaldehído y el furfural dieron resultados inhibiendo la formación de agallas en algodón (Bauske *et al.*, 1994).

Dentro de los flavonoides existen también aleloquímicos contra nematodos como la quercitina de amplia distribución en muchas plantas de varias familias, pero especialmente abundante en *Oenothera biennis* L., *Podophyllum peltatum* L. y *Allium cepa* L., el cual ha resultado efectivo para inhibir la reproducción de *M. javanica*

(Osman y Viglierchio, 1988). En frijol lima se ha encontrado que el comestrol y la psoradolina se producen en respuesta a la infección de *Pratylenchus scribneri* (Rich *et al.*, 1977).

Dentro de los compuestos de alto peso molecular, las lectinas, como la concanavalina A de *Canavalia ensiformis* L. DC., ha dado buenos resultados para el control de *M. incognita* en jitomate (Marbán-Mendoza *et al.*, 1989).

Ahora sabemos que los metabolitos pueden actuar como repelentes, inducen parálisis, reducen la eclosión o incluso pueden causar la muerte del nematodo (Wuyts, 2006). Existen numerosos trabajos en los que se brinda información sobre las posibilidades para controlar las poblaciones de nematodos mediante la acción de estos metabolitos, principalmente con el nematodo fitopatógeno *Meloidogyne* spp., que representa uno de los nematodos de gran importancia económica en el mundo (Moens *et al.*, 2009).

Existen diferentes formas de aprovechar los metabolitos secundarios. Debido al incremento en el conocimiento y estudios de la alelopatía una de las propuestas es la aplicación de enmiendas orgánicas de origen vegetal al suelo, ya que al incorporar residuos orgánicos éstos tienen un gran impacto en las propiedades físicas y biológicas del suelo además de promover el crecimiento de microorganismos antagonicos a los nematodos (Stirling, 1991).

2.5.3 Manejo de plantas contra *Meloidogyne* spp.

Una de las opciones para sustituir a los nematicidas sintéticos son los extractos de plantas con propiedades contra nematodos pero que están aún en proceso de formulación y comercialización (Kokalis-Burelle y Rodríguez-Kábana, 2006). Esta posibilidad se basa en el principio de que existen plantas que vivas o muertas son capaces de liberar compuestos nematotóxicos principalmente cuando entran en contacto con el agua, tomando en cuenta siempre las características del sustrato en que se encuentre el compuesto debido a la interacción con los otros compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en el suelo y los factores ambientales que influyen la actividad de los compuestos aleloquímicos con el resto del microambiente (Halbrendt, 1996).

Es así como se han realizado trabajos para encontrar sustancias alelopáticas que logren reducir los daños por *Meloidogyne* spp., nematodo que como se mencionó antes es de gran importancia económica. Como ejemplo tenemos el trabajo realizado por Pérez *et al.* (2003) en el que se logró reducir la tasa de reproducción de *Meloidogyne* tanto en *in vitro* como en condiciones de invernadero al comprobar que el aceite esencial de *Chrysanthemum coronarium* L. y las enmiendas orgánicas elaboradas con algunos miembros de la familia Asteraceae (*Chrysanthemum segetum* L., *Calendula marítima* Guss. 1825 Syn. *C. suffruticosa* subsp. *marítima* Meikle, *Calendula officinalis* y *C. suffruticosa* Vahl) son eficaces nematicidas.

A pesar de la inherente complejidad, se observó que al aplicar brasicas al sustrato es posible lograr un resultado consistente y repetible en la supresión de *Meloidogyne javanica* resultado de los procesos químicos desencadenados por esta incorporación (Zasada y Ferris, 2004).

También se logró la inhibición de la eclosión de huevos e incrementar la mortalidad de J2 de *M. incognita* al aplicar tratamientos de *Chromolaena odorata*, *Azadirachta indica* A.Juss, *Ricinus communis* L. y *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. observandose que al incrementar la concentración de las diluciones de los tratamientos y aumentar el tiempo de exposición se incrementó la mortalidad del nematodo (Adegbite y Adesiyani, 2005).

Ya que una forma de comprobar la factibilidad del uso de extractos vegetales es confrontarlos con los nematicidas químicos o comerciales, se confrontó un extracto acuoso de *Tagetes erecta* L. con el nematicida carbofuran en plantas infestadas con *Meloidogyne incognita* obteniendo como resultado un efecto similar por lo que se consideró viable la posibilidad de sustituir el nematicida químico por el extracto de *T. erecta* (Natarajan *et al.*, 2006).

En la evaluación de extractos acuosos de *Azadirachta indica* A.Juss, *Carica papaya* L., *Ocimum sanctum* L., *Ricinus communis* y *Tagetes patula* L. para el control de la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* en diferentes concentraciones, resultó que el mejor resultado lo mostró *O. sanctum* con una disminución de la eclosión del

34.8% a las 48 horas posteriores a la aplicación del tratamiento (Bharadwaj y Sharma, 2007).

Otro caso es el estudiado en la isla de Okinawa (Japón) en donde se evaluaron el efecto de extractos acuosos y etanólicos de especies originarias de la isla (*Bidens pilosa* var. *radiata* (Sch.Bip.) R.E. Ballard., *Hydrocotyle dichodroides* L., *Oxalis corymbosa* L , *O. corniculata* L. y *Stenactis annus* L.) sobre J2 de *Meloidogyne incognita* en donde el total de las plantas tuvieron un efecto nematicida siendo el mejor tratamiento el de *Bidens pilosa* (Taba *et al.*, 2008).

Así también se realizaron ensayos en invernadero y cubiertas climatizadas para evaluar la efectividad de extractos acuosos de *Euphorbia myrsinites* L. y *Urginea marítima* L. en la reducción del índice de agallamiento provocado por *M. incognita*, observandose que en dosis altas de los extractos se logra un efecto similar al Oxamil (Vydate® I, DuPont, carbamato como ingrediente activo) (Kaşkavalaci y Civelek, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

Se conocen diferentes métodos alternativos de control no químico para este nematodo, una de las opciones es el control biológico, que como ya se mencionó consiste en la incorporación en el hábitat/nicho de un organismo antagónico al patógeno como es el caso de los hongos nematófagos, como *Pochonia chlamydosporia*, que es un hongo con el que se ha trabajado relativamente poco en nuestro país y se han obtenido resultados positivos en el control de dos nematodos agalladores: *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne* sp.

El conocimiento generado mediante las actuales investigaciones, con respecto a las propiedades de los vegetales, se nos amplía el panorama en la explotación de vegetales para el control de diferentes patógenos incluyendo los nematodos.

Es sabido que no hay un método de control que de forma aislada logre un 100% de eficacia, es por eso que es necesario implementar un manejo integrado para disminuir los daños ocasionados por el patógeno. Con el fin de lograr integrar dos métodos (*Pochonia chlamydosporia* y extractos vegetales), es necesario conocer los efectos de la interacción entre ambos, iniciando con estudios en *in vitro* para luego evaluarlas bajo condiciones más cercanas a las de campo que finalmente nos brinden una opción de manejo agroecológico de *Meloidogyne incognita*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Evaluar la compatibilidad de la aplicación de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* y extractos vegetales para el manejo integrado de *Meloidogyne incognita* en el cultivo de frijol.

4.1.1 Objetivos particulares:

- a) Identificar la especie de *Meloidogyne* de la población experimental usada en el presente trabajo.
- b) Determinar el efecto fitotóxico de 22 polvos de plantas con propiedades alelopáticas sobre la emergencia y desarrollo de plántulas de frijol.
Determinar el efecto de los extractos vegetales sobre desarrollo micelial y producción de clamidosporas de *P. chlamydosporia*.
- c) Determinar el porcentaje de parasitismo de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* sobre los huevos de *Meloidogyne incognita* en presencia de extractos vegetales crudos en medio sólido, líquido y suelo.
- d) Determinar el efecto de la incorporación del hongo *P. c. var. chlamydosporia* y de los tres mejores extractos vegetales con propiedades nematocidas en plantas de frijol establecidas en macetas con suelo infestado con *Meloidogyne incognita* bajo condiciones de invernadero.

5. METODOLOGÍA

La investigación se realizó en el Departamento de Interacciones Planta-insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (CeProBi-IPN), que se encuentra ubicado en carretera Yautepec-Jojutla Km. 8.5, San Isidro, Yautepec, Morelos, México. También se realizó una estancia especial de investigación en Rothamsted Research en Harpenden, U.K.

5.1 Identificación la especie de *Meloidogyne*.

Para la obtención de hembras, las raíces agalladas fueron teñidas con fucsina ácida-lactoglicerol (Byrd *et al.*, 1983). Posteriormente se enjuagaron en agua y se pasaron a lactoglicerol. Las hembras se disectaron de las raíces de forma manual con pinzas de relojero y agujas de disección finas bajo el microscopio estereoscópico.

Para la elaboración de cortes perineales, se realizó un corte alrededor del área perineal (región donde se localizan la vulva y el ano) y luego los patrones se transfirieron a un portaobjetos de tal forma que la superficie externa de la cutícula esté orientada hacia arriba, finalmente se cubrió y montó entre portaobjetos y cubreobjetos con lactofenol para su observación en microscopio (100X). De acuerdo a las características de la región vulvar y anal se hizo la identificación de la especie (Karssen, 2002).

5.2 Origen e incremento de la población de *Meloidogyne incognita*.

Se colectaron muestras de suelo y raíces con síntomas de daño (agallas) de una parcela de frijol infestada con *Meloidogyne incognita* en el municipio de Xochitepec, Morelos (18°42' latitud norte, 99°11' longitud oeste a una altura de 1,109 metros sobre el nivel del mar). Las raíces colectadas mostraron un índice de agallamiento de 7 a 10 (figura 1) según la escala de Bridge y Page (1980) en Coyne *et al.* (2007) (ver Anexo 7).

El suelo y raíces se mezclaron con peatmoss (Sunshine®, Canadá) y perlita (agrolita®, México) en relación de peso 2:2:1 respectivamente. Posteriormente se

colocó el sustrato en macetas de 20cm de diámetro con capacidad de 8 L en las que se plantó una plantula de jitomate var. “saladet”.

A los 45 días se sacaron las plantas de las macetas. Una parte de las raíces agalladas fueron utilizadas en otros ensayos y otra parte para reincorporar estas raíces al suelo con el fin de mantener y reproducir la población del nematodo hasta obtener índices de agallamiento similares a los de la población inicial. Para ello, en ese mismo suelo o sustrato infestado, una nueva planta de jitomate es transplantada en el sustrato. Alternativamente, se siembran semillas de otra especie susceptible de ser parasitada por el nematodo, como lo sería el frijol.



Figura 1. Raíz agallada por *Meloidogyne incognita* proveniente del municipio de Xochitepec, Morelos.

5.3 Origen, mantenimiento y producción de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

El aislamiento de *P. c.* var. *chlamydosporia* que se empleó en el trabajo fue la cepa SC1 (Pc341 en la colección de Rothamsted Research) (Proporcionado por M.C. Francisco Franco-Navarro. Laboratorio de Nematología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Estado de México), la cual se multiplicó en medio papa-dextrosa-agar (PDA) y harina de maíz-agar (HMA) según el interés de obtener mayor número de conidias o clamidosporas. Para el ensayo realizado en invernadero se produjo el hongo de forma masiva usando como sustrato arroz (Hidalgo *et. al.*, 2000).

Este aislamiento fue identificado molecularmente por Flores-Camacho *et al.* (2009) en Rothamsted Research como perteneciente a la variedad *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* basado en el análisis de la PCR- β tubulina que consiste en la reacción en cadena de la polimerasa basado en la β tubulina.

También fue utilizado el aislamiento con origen brasileño Pc10, el cual se encuentra en la colección de Rothamsted Research y es usado en medida de lo posible como referencia en trabajos realizados con *P. c.* var. *chlamydosporia*.

5.4 Colecta de plantas con propiedades contra nematodos.

De las 833 plantas reportadas por Duke (2008) con propiedades contra nematodos se seleccionaron aquellas presentes en la región de estudio que además son de fácil obtención. Se colectaron e identificaron 22 especies de plantas (Cuadro 1) procurando obtener en medida de lo posible la totalidad de la planta con partes vegetativas y/o reproductivas. La identificación se hizo recabando los nombres vulgares y científicos de cada especie, comparando los ejemplares colectados con los del Herbario Nacional de México MEXU del Instituto de Biología de la UNAM.

Cuadro 1. Plantas con propiedades contra nematodos colectadas e identificadas en el estado de Morelos.

Nombre científico	Nombre común	Mes de colecta	Partes colectadas
<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd	Huizache	diciembre	hoja, tallo, flor, raíz
<i>Argemone mexicana</i> L.	Chicalote	diciembre	hoja, tallo, flor, fruto, semilla
<i>Bidens pilosa</i> L.	Aceitillo	noviembre	hoja, tallo, flor, fruto, semilla
<i>Calendula officinalis</i> L.	Caléndula	enero	hoja, tallo, flor
<i>Chenopodium album</i> L.	Epazote borrego	enero	hoja, tallo, raíz
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Epazote	noviembre	hoja, tallo
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	Eucalipto	enero	hoja
<i>Cyperus rotundus</i> L.	Coquillo	diciembre	hoja, tallo, flor, fruto, semilla
<i>Datura stramonium</i> L.	Toloache	enero	tallo, hoja, flor
<i>Jatropha curcas</i> L.	Jatrofa	diciembre	hoja, tallo, fruto, semilla
<i>Mentha spicata</i> Crantz	Hierbabuena	diciembre	hoja, tallo, flor, raíz
<i>Lantana camara</i> L.	Lantana	diciembre	hoja, tallo, flor, fruto, semilla
<i>Melia azedarach</i> L.	Paraíso	diciembre	hoja, tallo, flor
<i>Nerium oleander</i> L.	Rosa laurel	diciembre	hoja, tallo, flor
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Albahaca	enero	hoja, tallo, raíz, flor
<i>Prosopis glandulosa</i> Torr	Mezquite	diciembre	hoja, tallo, flor
<i>Origanum vulgare</i> L.	Orégano	enero	corteza, tallo, hoja
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Romero	enero	flor, ejote, hoja, tallo, raíz
<i>Ricinus communis</i> L.	Higuerilla	enero	hoja, tallo, fruto
<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	Rabanillo	enero	hoja, tallo
<i>Tagetes lucida</i> L.	Pericón	noviembre	hoja, tallo, flor, raíz
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomillo	enero	hoja, tallo

Las plantas fueron colectadas en diferentes localidades del estado de Morelos ya sea en campo o en mercados locales. El total del material vegetal se sometió a un proceso de secado en sombra, pulverización (molino de martillos rotatorios) y envasado en frascos ámbar para su posterior uso.

5.5 Efecto de polvos vegetales sobre la emergencia y el desarrollo de plántulas de frijol.

Se estableció un ensayo en invernadero con un diseño completamente al azar teniendo 22 tratamientos más un testigo al cual no se le aplicó ningún tratamiento. Cada tratamiento tuvo seis repeticiones siendo la unidad experimental una charola de plástico cristalino de 30x20cm con seis semillas de frijol de la variedad Strike.

El sustrato utilizado fueron 600g de una mezcla de suelo, peatmoss (Sunshine®, Canadá) y perlita (agrolita®, México) en relación de peso 2:2:1 respectivamente y por cada 100g de sustrato se le adicionó 1g de polvo vegetal.

Se cuantificó la emergencia a los siete días posteriores a la siembra ya que para esa fecha las plantas ya habían desarrollado hojas verdaderas y se puede observar si hay algún indicio de fitotoxicidad por efecto de los tratamientos. El peso fresco de las plantas se registró 14 días después de la siembra, para lo que se retiraron las plantas del sustrato y se eliminó el sustrato de las raíces con una pequeña brocha, se pesó cada grupo de plantas de cada una de las unidades experimentales; finalmente el peso seco se tomó posterior a un secado en estufa por un periodo de 3 días a una temperatura de 70°C.

Los datos que se recabaron de las variables (emergencia, peso fresco y peso seco) se analizaron con el paquete estadístico SigmaStat 3.5 mediante un Kruskal-Wallis ya que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad e igualdad de la varianza, posteriormente se realizó una comparación de medias de Dunn, tomando en cuenta que solo se quiso descartar un efecto fitotóxico por parte de los tratamientos hacia el frijol, todos los tratamientos fueron confrontados contra el control, no entre tratamientos.

5.6 Efecto de los extractos vegetales crudos sobre el crecimiento micelial y la producción de clamidosporas de *P. c. var. chlamydosporia*.

Se estableció un bioensayo a nivel laboratorio bajo un diseño completamente al azar, con 22 tratamientos más un testigo al cual no se le aplicó extracto vegetal.

Cada tratamiento constó de cinco repeticiones siendo la unidad experimental una caja Petri.

Para la elaboración de extractos vegetales crudos al 10%, entendiéndose por crudos al utilizar solo agua como vehículo se tomaron 10g de polvo de cada una de las plantas y éstos se adicionaron a 90ml de agua destilada estéril. La mezcla se dejó reposar por un periodo de 24hrs a $9^{\circ}\text{C}\pm 1$, pasado este tiempo el líquido fue filtrado con gasa triple.

Del extracto líquido resultante se tomó una alícuota de 10ml que se añadió a 90ml de medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA)(BD Bioxon®, México) para posteriormente ser esterilizado, por lo que se obtuvo una concentración final en el medio de cultivo de extracto de 1% del extracto.

El medio se vertió en cajas Petri de 7cm de diámetro. Una vez solidificado el medio se colocó un disco de medio de cultivo PDA de 0.5cm de diámetro con crecimiento del aislamiento Pc341 del hongo *P. chlamydosporia* con una edad de 28 días en cada una de las cajas.

Se hizo una lectura diaria con un vernier común del crecimiento micelial diario durante los siguientes 14 días en que se mantuvieron las cajas en incubadora a 26°C . También se contabilizó la concentración de clamidosporas ml^{-1} producidas en ese mismo periodo. Los datos recabados en ambos casos se sometieron a un análisis estadístico de análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias según Tukey ($P=0.05$) con el programa estadístico SigmaStat 3.5.

5.6.1 Producción de clamidosporas de dos aislamientos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en presencia de cinco extractos vegetales acuosos.

Para enriquecer la información de los ensayos previos se realizó una estancia especial de investigación en Rothamsted Research, Harpenden (U.K.), en la cual en primera instancia se montó un experimento para conocer el efecto de cinco plantas originarias del estado de Morelos (México) sobre la producción de clamidosporas de

dos aislamientos, esto siguiendo un diseño experimental de bloques al azar, usando como unidad experimental una caja Petri de 12cm de diámetro con medio de cultivo Czapek o harina de maíz-agar (Oxoid, Basingstoke, UK) previamente esterilizado, esto para conocer el comportamiento del hongo en presencia de los extractos en por lo menos dos medios que son usados para la obtención de clamidosporas; posteriormente se le añadió al medio de cultivo extracto vegetal acuoso crudo (Anexo 1) para lograr una concentración del 10%.

Los tratamientos empleados fueron cuatro plantas mexicanas con antecedentes de sus propiedades contra nematodos colectadas en el estado de Morelos, un aislamiento mexicano (Pc341=SC1) así como otro aislamiento brasileño (Pc10) o cepa estándar de *P. c. var. chlamydosporia*. Los tratamientos quedaron de la forma siguiente:

- | | |
|--|---|
| 1. Czapek + PC341 + <i>Argemone mexicana</i> | 11. HMA + PC341 + <i>Nerium oleander</i> |
| 2. HMA + PC341 + <i>Datura stramonium</i> | 12. Czapek + PC341 + <i>Nerium oleander</i> |
| 3. Czapek + PC10 + <i>Datura stramonium</i> | 13. Czapek + PC10 TESTIGO |
| 4. HMA + PC341 + <i>Argemone mexicana</i> | 14. Czapek + PC341 TESTIGO |
| 5. Czapek + PC10 + <i>Argemone mexicana</i> | 15. HMA + PC341 TESTIGO |
| 6. Czapek + PC341 + <i>Datura stramonium</i> | 16. HMA + PC10 TESTIGO |
| 7. Czapek + PC341 + <i>R. raphanistrum</i> | 17. Czapek + PC10 + <i>R. raphanistrum</i> |
| 8. HMA + PC10 + <i>Datura stramonium</i> | 18. Czapek + PC10 + <i>Nerium oleander</i> |
| 9. HMA + PC10 + <i>Argemone mexicana</i> | 19. HMA + PC10 + <i>R. raphanistrum</i> |
| 10. HMA + PC341 + <i>Raphanus raphanistrum</i> | 20. HMA + PC10 + <i>Nerium oleander</i> |

Para realizar el conteo de la producción de clamidosporas se realizó un lavado de cada una de las cajas añadiendo 5ml de agua destilada estéril, se raspó gentilmente la superficie del agar con un triángulo de vidrio y se tomó una alícuota de 0.2ml que se llevaron a un hematocitómetro para realizar el conteo requerido. Los datos obtenidos se analizaron mediante un ANOVA de una siendo la variable a medir el aislamiento y dos vías, en donde las variables fueron el medio de cultivo y el extracto. Se realizó una comparación de medias según Tukey (0.05) con el programa SigmaPlot 10.0.

5.7 Efecto de los extractos vegetales acuosos sobre la movilidad de juveniles de segundo estadio de *Meloidogyne incognita*.

Se montó un bioensayo bajo un diseño completamente al azar de 22 tratamientos más un testigo (sin extracto vegetal) con cinco repeticiones, siendo la unidad experimental un pequeño pozo de plástico de 2.5cm de diámetro y un 1cm de profundidad en el que se colocaron 1ml de agua destilada y 1ml de extracto vegetal acuoso. Este último se elaboró previamente añadiendo 10g de polvo vegetal a 90ml de agua destilada estéril y se dejó reposar por un periodo de 24hrs a 10°C; pasado este tiempo se filtró con una gasa triple. Finalmente a cada pozo se le añadió 1ml de una suspensión con un número aproximado de 60 J2.

Se cuantificó el número de nematodos móviles: 1, 3, 12, 36 y finalmente a las 72hrs posteriores a la aplicación del tratamiento con respecto al número de nematodos móviles. Tomando éste último momento ya que es cuando se observan síntomas de descomposición de los nematodos que no recuperan la movilidad y se puede confirmar el bloqueo de la cetilcosina,

Los tratamientos se agruparon dependiendo el efecto de los extractos sobre los J2: Grupo1, efecto constante sin recuperación de la movilidad hasta las 72hrs, es decir, un efecto nematocida; Grupo 2, efecto nematostático, con recuperación de la movilidad antes de las 72hrs y el Grupo 3 que son los tratamientos que no mostraron ningún efecto de los anteriores.

En el caso del grupo conformado por el efecto nematocida, los datos fueron analizados por un ANOVA de dos vías y una comparación de medias según Tukey ($P=0.05$) con el paquete estadístico SigmaStat 3.5.

El resto de los grupos no se analizaron estadísticamente ya que para llevar a cabo la selección de los mejores tratamientos se contemplaron solo los que mostraron un efecto nematocida.

5.8 Parasitismo de huevos de *Meloidogyne* sp. por *P. c.* var. *chlamydosporia* en presencia de extractos vegetales acuosos en medio sólido.

Se montó un experimento completamente al azar de 22 tratamientos más dos testigos (uno sin tratamiento de extracto vegetal y uno con solamente huevos), siendo la unidad experimental una caja Petri de 12cm de diámetro con medio agua-agar.

Posteriormente se añadió extracto vegetal acuoso al 10%, el cual fue elaborado añadiendo en 90ml de agua destilada estéril 10g de polvo vegetal, éste se dejó en reposo por 24hrs a $9^{\circ}\text{C}\pm 1$, pasadas 24hrs se filtró con gasa doblada tres veces (gasa triple) para obtener el extracto necesario.

Del extracto resultante se adicionaron 50ml a 50ml de medio de cultivo para lograr una concentración final del extracto vegetal del 5%. El extracto fue vertido al medio de cultivo y se llevo por un proceso de esterilización. Cuando se entibió el medio se aplicaron antibióticos (0.5mg de cloranfenicol + 0.5mg de clorhidrato de tetraciclina/L). Finalmente el medio fue vertido en cajas Petri.

A cada caja Petri se le aplicó una alícuota de $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ clamidosporas de *P. chlamydosporia* (anexo 4) que se dejó incubar por un periodo de 48hrs para posteriormente añadir una alícuota de 1ml que contuvo un número aproximado de 500 huevos de *Meloidogyne incognita* (anexo 2). Los resultados de este ensayo fueron tomados en diferentes tiempos, 48hrs para los tratamientos y 72hrs para los testigos, esto debido a que el crecimiento de *P. c.* var. *chlamydosporia* es más rápido al adicionar el extracto vegetal.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un ANOVA y comparación de medias según Tukey ($P= 0.05$).

5.8.1 Parasitismo de huevos de *Meloidogyne incognita* por *P. c. var. chlamydosporia* en presencia de extractos vegetales acuosos en medio nutritivo líquido.

Para enriquecer este trabajo esta fase fue complementada con ensayos realizados en la estancia especial realizada en Rothamsted, Research (U.K.).

El experimento se siguió bajo un diseño de bloques al azar en el que cada bloque se monto con una diferencia de dos o tres días. Se usaron cinco plantas mexicanas y una muestra africana proveniente de Kenya (*Crotalaria* sp.), así como dos aislamientos de *P. c. var. chlamydosporia*: PC341(=SC1) mexicano y Pc10 brasileño. Los tratamientos quedaron de la siguiente forma:

Tratamientos:

- | | |
|---|---|
| 1. EL + Pc10 + <i>Datura stramonium</i> | 9. EL + Pc341 + <i>Argemone mexicana</i> |
| 2. EL + Pc10 + <i>Argemone Mexicana</i> | 10. EL + Pc341 + <i>Nerium oleander</i> |
| 3. EL + Pc10 + <i>Nerium oleander</i> | 11. EL + Pc341 + <i>Chenopodium album</i> |
| 4. EL + Pc10 + <i>Chenopodium album</i> | 12. EL + Pc341 + <i>Raphanus raphanistrum</i> |
| 5. EL + Pc10 + <i>Raphanus raphanistrum</i> | 13. EL + Pc341 + <i>Crotalaria</i> |
| 6. EL + Pc10 + <i>Crotalaria</i> | 14. TESTIGO + Pc341 (EL solo) |
| 7. TESTIGO + Pc10 (solo EL) | 15. TESTIGO negativo (huevos solos) |
| 8. EL + Pc341 + <i>Datura stramanium</i> | |

La unidad experimental consistió en un tubo de vidrio estéril de 25ml de capacidad con 4ml de medio nutritivo líquido de extracto de levadura (EL) (Mikrobiologie®. Darmstadt, Germany), 4ml de extracto vegetal (Anexo 1), 1ml de una suspensión con un número aproximado de 1000 huevos (Anexo 2) y 1ml de la suspensión de conidias (Anexo 5) con una concentración de $5.5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ de *P. c. var. chlamydosporia*. Los testigos, que no incluyeron extracto vegetal, se duplicó la cantidad de EL en el frasco, es decir 8ml. Se tomó un doble testigo negativo, el cual sólo contuvo 9ml de agua estéril más 1ml de la solución de huevos. Los tubos se mantuvieron a 26°C de temperatura en agitación constante de 150 rpm en incubadora (Innova® 40, shaker series).

Los datos del porcentaje de parasitismo se tomaron a las 24 y 48hrs posteriores al montaje del ensayo, para lo cual se tomó una alícuota de 3ml que se colocó en una cámara para contar nematodos. Se contaron un total de 100 huevos, registrando los parasitados y no parasitados.

El experimento se realizó por duplicado, debido a que no se encontraron diferencias posteriores a un ANOVA entre ambos experimentos ($F=1.47$, $gl=1,6$ $P=0.271$), los datos fueron analizados como uno solo. Para el análisis de los datos no fue necesario transformarlos ya que pasaron las pruebas de la normalidad e igualdad de la varianza, finalmente los datos se analizaron con un ANOVA de medidas repetidas.

5.8.2 Parasitismo de *P. c. var. chlamydosporia* sobre huevos de *Meloidogyne incognita* en presencia de los extractos vegetales acuosos en suelo

De igual forma que el experimento anterior se realizó un experimento con dos aislamientos de *P. c. var. chlamydosporia*, uno brasileño PC10 y uno mexicano Pc341 (=SC1), así como cinco extractos acuosos de plantas mexicanas con propiedades contra nematodos.

- | | |
|--|--|
| 1. Pc10 + <i>Datura stramonium</i> | 7. Pc341 + <i>Datura stramonium</i> |
| 2. Pc10 + <i>Argemone mexicana</i> | 8. Pc341 + <i>Argemone mexicana</i> |
| 3. Pc10 + <i>Nerium oleander</i> | 9. Pc341 + <i>Nerium oleander</i> |
| 4. Pc10 + <i>Chenopodium album</i> | 10. Pc341 + <i>Chenopodium album</i> |
| 5. Pc10 + <i>Raphanus raphanistrum</i> | 11. Pc341 + <i>Raphanus raphanistrum</i> |
| 6. Pc10 TESTIGO | 12. Pc341 TESTIGO |

El diseño experimental fue factorial.

Se contó con suelo estéril y aireado previamente, del cual se tomaron 50g de suelo por unidad experimental, siendo éstos pequeños semilleros de 5cm³ de capacidad.

Cada unidad experimental se inoculó con una solución de clamidosporas de *P. c. var. chlamydosporia* (Anexo 4) en una concentración de 5×10^4 clamidosporas g^{-1} de suelo contenidas en 3ml de agua destilada estéril. Por cada unidad experimental se colocaron 10 masas (previamente enjuagadas con agua destilada estéril (Anexo 2-a)) (Anexo 2) de huevos de *M. incognita* contenidas entre dos telas de nylon con una apertura de malla de $60 \mu m$ y sostenidas entre dos placas para diapositivas fotográficas (Lockertex, Warrington, Cheshire, UK). A cada unidad se le aplicó un tratamiento inicial de 10ml de extracto acuoso al 25% de concentración (Anexo, 1). Subsecuentemente, a cada unidad experimental se le agregaron 10ml de agua destilada estéril para proporcionar la humedad necesaria para el desarrollo adecuado del hongo y mantener la viabilidad de los huevos del nematodo. Los semilleros fueron colocados en bolsas de poli-papel para permitir la mejor conservación de humedad y se dejaron a temperatura ambiente ($20^{\circ}C \pm 2$). Al día 12 se tomaron las masas de huevos que fueron disgregadas y colocadas en placas de medio semi-selectivo (Anexo 6). Las placas con los huevos se mantuvieron a $25^{\circ}C$ durante 3 días para observar el crecimiento característico de *P. chlamydosporia* y cuantificar el porcentaje de parasitismo de los huevos de *M. incognita* en presencia de extractos vegetales acuosos con propiedades contra nematodos. Los datos se llevaron por el análisis estadístico ANOVA con el paquete estadístico GenStat versión 8.3 para su interpretación.

5.9 Efecto de polvos vegetales nematocidas solos y en combinación con *P. c. var. chlamydosporia* sobre plantas de frijol establecidas en suelo infestado con *Meloidogyne incognita*

Las raíces que se utilizaron para inocular el suelo de este experimento fueron el producto del incremento de la población de *Meloidogyne incognita* proveniente de Xochitepec, Morelos y consistió en raíces con un índice de agallamiento entre 6 a 8 (ver sección 5.1).

Para la mezcla final que se utilizó como sustrato, las raíces cortadas en segmentos (aproximadamente de 0.5cm), ya trituradas se mezclaron con el suelo del que provenían estas mismas raíces, la mezcla se complementó con peatmoss

(Sunshine®, Canadá) y perlita (agrolita®, México) en relación de peso 2:2:1 respectivamente.

El diseño experimental fue al azar. A cada unidad experimental se le añadió, según el tratamiento: 6g de polvo vegetal por cada maceta con 600g de sustrato, arroz inoculado con *P. c. var. chlamydosporia* (5×10^6 esporas g^{-1}) (anexo 5) o bien nematicida comercial carbofuran en solución de 4cc L^{-1} y aplicando 50cc por maceta. Los tratamientos se aplicaron antes de la siembra. Cabe hacer mención que se mantuvo un testigo de suelo sin *Meloidigyne incognita*, para verificar que el suelo ni estuviera contaminado con algún otro nematodo agallador.

Los tratamientos quedaron de la forma siguiente:

1. Suelo infestado con *M. incognita* sin tratamiento
2. Nematicida (Furadan 350®)
3. *P.c. var. chlamydosporia*
4. *Thymus vulgaris*
5. *Chenopodium album*
6. *Raphanus raphanistrum*
7. *Thymus vulgaris* + *P. c. var. chlamydosporia*
8. *Chenopodium album* + *P. c. var. chlamydosporia*
9. *Raphanus raphanistrum* + *P. c. var. chlamydosporia*
- 10.. *Thymus vulgaris* + *Chenopodium album* + *Raphanus raphanistrum* y *P. c. var. chlamydosporia*.

Cabe resaltar que el del nematicida utilizado es carbofuran (2,2-dimethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl methylcarbamate)

Los datos recabados fueron: índice de agallamiento (Coyne *et al.*, 2007) (anexo 7) así como producción de ejote y los resultados fueron analizados mediante Kruskal-Walis o bien ANOVA según fue el caso y se realizó la comparación de medias respectiva.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación de la especie de *Meloidogyne*

La identificación se hizo basándose en patrones perineales (Karszen, 2002), los cuales fueron similares a los de la especie *M. incognita*. Éstos mostraron una forma desde ovalada a circular, con arco dorsal alto y cuadrado (Figura 2), las estrías onduladas, campos laterales tenues o ausentes y estrías bifurcadas (Hunt y Handoo, 2009), un estilete de 15 a 16µm de largo generalmente con nódulos basales redondeados (Figura 3).

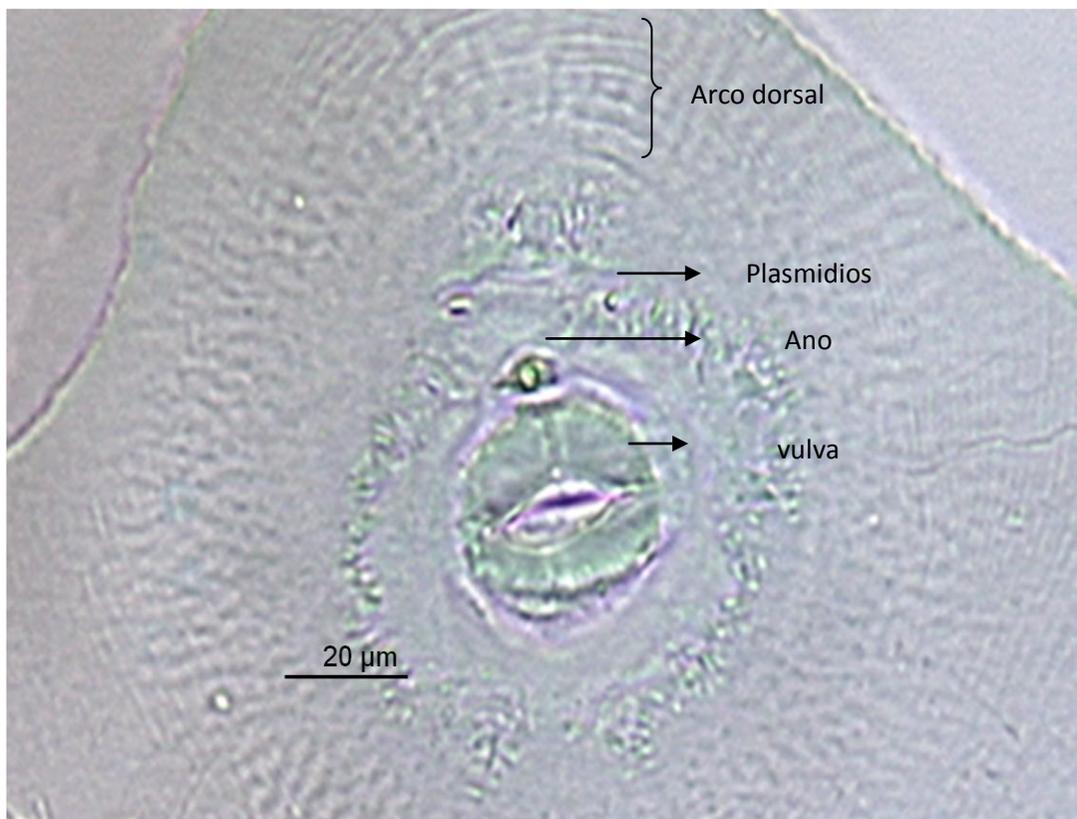


Figura 2. Corte de patrón perineal de *Meloidogyne incognita* de un ejemplar proveniente de la población de estudio.

Meloidogyne se encuentra distribuida con mayor frecuencia en ambientes no secos. Se trata de una especie termófila, es decir, que no es capaz de sobrevivir en temperaturas inferiores a los 10°C y la temperatura media ideal para su desarrollo es de 27°C (Evans y Perry, 2009), estas son características de clima que encontramos en la región de estudio.



Figura 3. Tercio anterior del cuerpo de hembra de *Meloidogyne incognita* de un ejemplar proveniente de población de estudio.

Se ha reportado que las agallas que produce esta especie en el hospedante son largas e irregulares (Hunt y Handoo, 2009), similares a lo observado en la población de Morelos (Figura 4).



Figura 4. Agallas en raíz de frijol parasitada por *M. incognita*.

De las características de las plantas parasitadas y las hembras que se observaron se llegó a la conclusión que la especie presente en la región de estudio es *M. incognita*.

6.2 Efecto de los polvos vegetales sobre la emergencia y desarrollo de plántulas de frijol

Al confrontar el total de los tratamientos contra el testigo (Cuadro 2). Los resultados no mostraron evidencias de modificación en el desarrollo de las plantas de frijol.

Cuadro 2. Efecto de extractos acuosos con propiedades contra nematodos en el desarrollo de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*)

Tratamiento	Mediana % emergencia			Mediana del peso fresco			Mediana del peso seco		
TESTIGO	83.33<	91.67	<100	9.40<	9.55	<10.40	1.20<	1.30	<1.30
<i>Acacia farnesiana</i>	----	100	----	9.90<	10.60	<11.80	1.40<	1.60	<1.60
<i>Argemone mexicana</i>	83.33<	91.67	<100	7.60<	8.75	<9.70	0.80<	1.00	<0.80
<i>Bidens pilosa</i>	----	83.33	<100	10.1<	10.80	<11.30	1.20<	1.30	<1.30
<i>Calendula officinalis</i>	83.33<	91.67	<100	11.1<	11.70	<12.40	1.30<	1.45	<1.20
<i>Chenopodium album</i>	----	83.33	<100	5.50<	5.60	<7.10	0.70<	0.80	<0.70
<i>Ch.ambrosioides</i>	----	83.33	<100	9.70<	10.10	<12.10	1.30<	1.40	<1.20
<i>Cyperus rotundus</i>	----	83.33	----	8.60<	10.80	<12.50	0.90<	1.40	<1.30
<i>Datura stramonium</i>	83.33<	100	----	5.70<	6.90	<7.10	0.60<	1.00	<0.80
<i>Eucalyptus globulus</i>	66.67<	83.33	----	6.20<	7.75	<8.70	1.10<	1.20	<1.00
<i>Jatropha curcas</i>	50.00<	83.33	<100	5.50<	8.50	<12.00	0.80<	0.90	<0.70
<i>Lantana camara</i>	83.33<	100	----	8.10<	8.60	<10.10	1.20<	1.25	<1.10
<i>Melia azedarach</i>	----	66.67	<83.3	4.10<	6.70	<7.10	0.60<	0.95	<0.90
<i>Mentha spicata</i>	50.00<	66.67	----	6.50<	8.00	<10.60	1.00<	1.25	<0.90
<i>Nerium oleander</i>	50.00<	66.67	<83.3	6.50<	8.35	<9.10	1.10<	1.30	<1.10
<i>Ocimum basilicum</i>	----	66.67	<83.3	6.30<	9.05	<10.30	0.70<	0.75	<0.60
<i>Origanum vulgare</i>	83.33<	100	----	6.30<	7.35	<8.90	1.00<	1.20	<1.00
<i>Prosopis glandulosa</i>	66.67<	83.33	----	5.90<	6.90	<8.60	0.70<	0.80	<0.50
<i>R. raphanistrum</i>	83.33<	91.67	<100	6.70<	8.50	<8.90	0.80<	0.95	<0.70
<i>Ricinus communis</i>	83.33<	100	----	8.20<	8.90	<9.70	0.90<	0.90	<0.60
<i>R. officinalis</i>	83.33<	100	----	8.70<	9.10	<9.30	1.10<	1.25	<1.20
<i>Tagetes lucida</i>	83.33<	100	----	7.50<	8.55	<10.60	1.00<	1.10	<0.80
<i>Thymus vulgaris</i>	66.67<	75.00	<83.3	6.70<	6.75	<7.30	0.90<	1.05	<0.90
Kruskal-Wallis; Dunn's	H=53			H=59.8			H=56.8		

Como podemos observar en el Cuadro 2, el total de los datos, al confrontarlos con el testigo, no muestran diferencias significativas, lo que nos lleva a deducir que no hay un efecto fitotóxico provocado por los tratamientos sobre las plantas de frijol.

Algunas de las plantas evaluadas carecen de evidencia de poseer propiedades alelopáticas, pero se sabe que *A. mexicana*, *C. rotundus*, *C. ambrosioides*, *C. album*, *D. stramonium*, *E. globulus*, *R. raphanistrum* y *T. vulgaris* si las tienen (Grainge y Ahmed, 1988).

Si bien se sabe que las sustancias alelopáticas pueden afectar la germinación, emergencia o desarrollo de diversos vegetales, la toxicidad puede estar en función de la planta con la que se lleva esta interacción; como se observó en el trabajo realizado por Ávila *et al.* (2007), en el que polvos de *Eucaliptus globulus* retrasaron el crecimiento de forma notable en algunas monocotiledóneas (maíz, arroz y sorgo) y no así en dicotiledóneas (arveja, lechuga y frijol) en las que no se vio afectado el desarrollo de las plantas.

Guedes *et al.* (2002), confirmaron la presencia de propiedades alelopáticas en extractos de la parte aérea de *Cyperus rotundus* L. Además en trabajos realizados para evaluar el efecto de *C. rotundus* sobre diversos cultivos como el maíz, se mostró que hay efecto negativo sobre la germinación y desarrollo de la planta, en donde el efecto negativo depende de la parte de la planta utilizada (Laynez-Garzaball y Méndez-Natera, 2006). También estos autores evaluaron a *C. rotundus* sobre *Phaseolus vulgaris* encontrando que la germinación, el peso seco de la radícula y la relación peso seco de la plantula/peso se vieron afectados dependiendo la concentración de los extractos evaluados (Laynez-Garsaball y Méndez-Natera, 2006).

Varias de las especies vegetales utilizadas como polvos han sido reportadas como alelopáticas como es el caso de *A. mexicana*, *E. globulus* y *D. stramonium*. En este trabajo no se encontraron evidencias de efectos alelopáticos que afecten el desarrollo de las plantas de frijol, se debe considerar siempre que algunos de los compuestos alelopáticos presentes en estas plantas y sus efectos, a su vez son

influenciados por las características físicas, químicas y biológicas del sustrato en que se encuentran, determinando su grado de difusión y estabilidad química en el tiempo.

El ambiente aéreo también influye en la calidad y cantidad de los aleloquímicos ya que la temperatura, la humedad y otros factores pueden permitir o no que los compuestos entren en contacto con los nematodos o bien puede haber requerimientos especiales meteorológicos para que se inicie la síntesis de compuestos aleloquímicos (Halbrendt, 1996).

En general la ausencia de un efecto fitotóxico por parte de los extractos que se probaron sobre las plantas de frijol puede deberse a diversos factores: 1) La naturaleza química de los extractos, 2) los aleloquímicos que liberan las plantas probadas no son de amplio espectro y no afectan al frijol; 3) las partes de las plantas utilizadas no tienen efecto alelopático sobre las plantas de frijol evaluadas; 4) especies distintas de las plantas utilizadas, o las etapas fenológicas de las plantas utilizadas no producen los aleloquímicos que pudieran ser tóxicos al frijol, lo cual se tendría que demostrar experimentalmente; la concentración de las sustancias alelopáticas fue insuficiente para causar daño al frijol (Altieri y Doll, 1978).

6.3 Efecto de los extractos vegetales acuosos sobre la tasa de crecimiento micelial y la producción de clamidosporas de *P. c. var. chlamydosporia*.

Crecimiento micelial. En la figura 5 se muestra que los tratamientos con *Calendula officinalis* y *Chenopodium ambrosioides* fueron estadísticamente diferentes al resto al disminuir el crecimiento micelial de *P. c. var. chlamydosporia*.

Producción de clamidosporas. A diferencia del crecimiento micelial, la producción de clamidosporas mostró diferencias estadísticas. Como podemos observar en la figura 6 el tratamiento que indujo la mayor producción de clamidosporas fue *Datura stramonium*, seguido de *Chenopodium album* y *Raphanus raphanistrum*.

Sólo dos de los tratamientos produjeron menos clamidosporas que el testigo: *Jatropha curcas* y *Chenopodium ambrosioides*.

La importancia de la producción de clamidosporas radica en que la presencia o ausencia de éstas determinan en gran medida el establecimiento y permanencia del hongo en el suelo, esto debido a que las clamidosporas son principalmente las estructuras de resistencia del hongo (Kerry y Bourne, 1996).

Una razón de las diferencias observadas en el comportamiento del hongo con los diferentes extractos puede ser que la mayoría de las plantas con propiedades contra hongos tienen compuestos químicos con un espectro de acción reducido a una sola o pocas especies de hongos (Montes-Belmont, 2009) por lo que, aún cuando existan antecedentes de propiedades antifúngicas en varias de las especies probadas, sólo dos de ellas fueron capaces de afectar el desarrollo de *P. c. var. chlamydo sporia*.

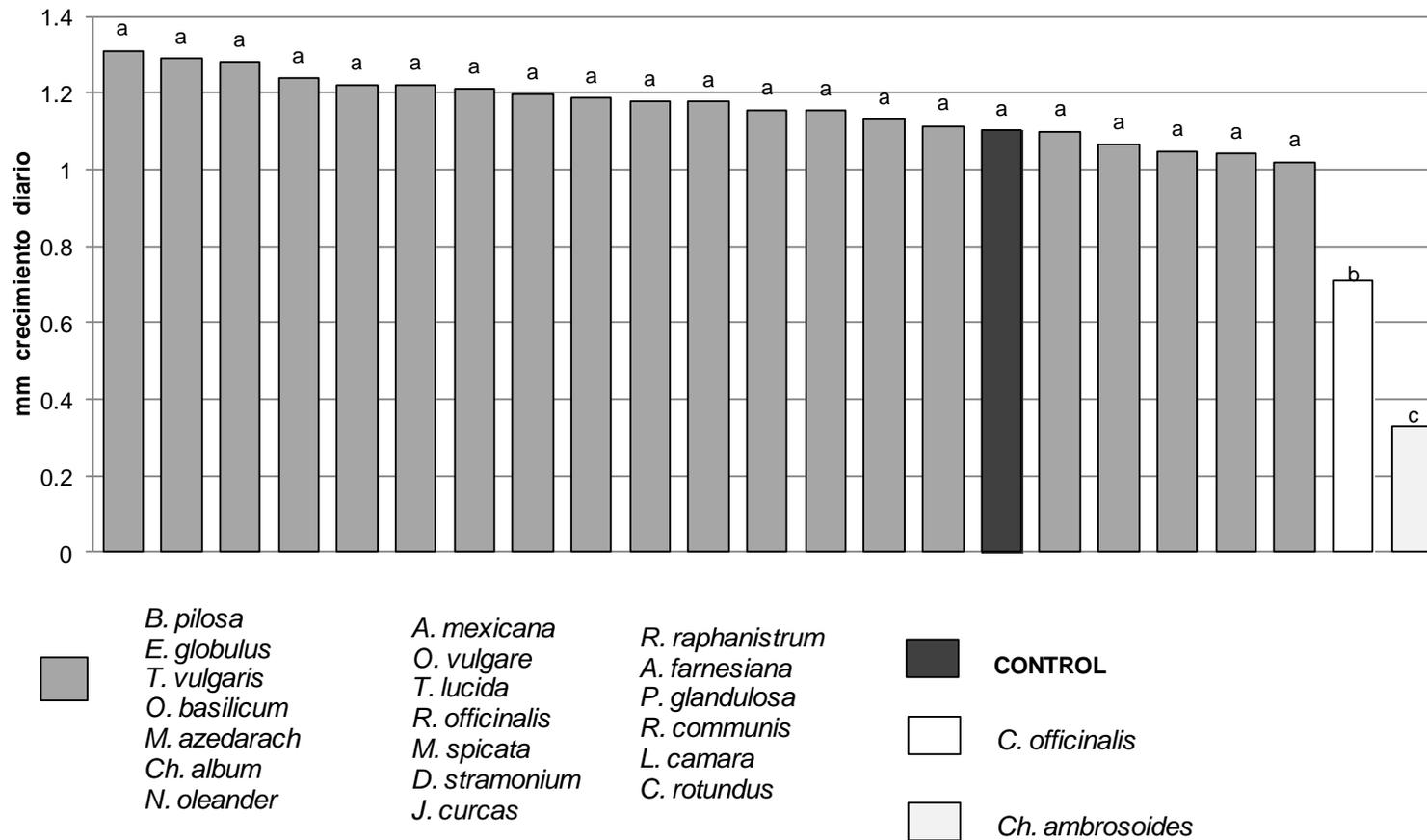


Figura 5. Media (\pm DE) del crecimiento micelial diario (mm) de *Pochonia c. var. chlamydosporia* en presencia de extractos vegetales acuosos ANOVA (Tukey, $P=0.05$). Literales distintas significan diferencias entre tratamientos ($F=16.9$, $gl=5$, $P<0.01$). DE=desviación estándar.

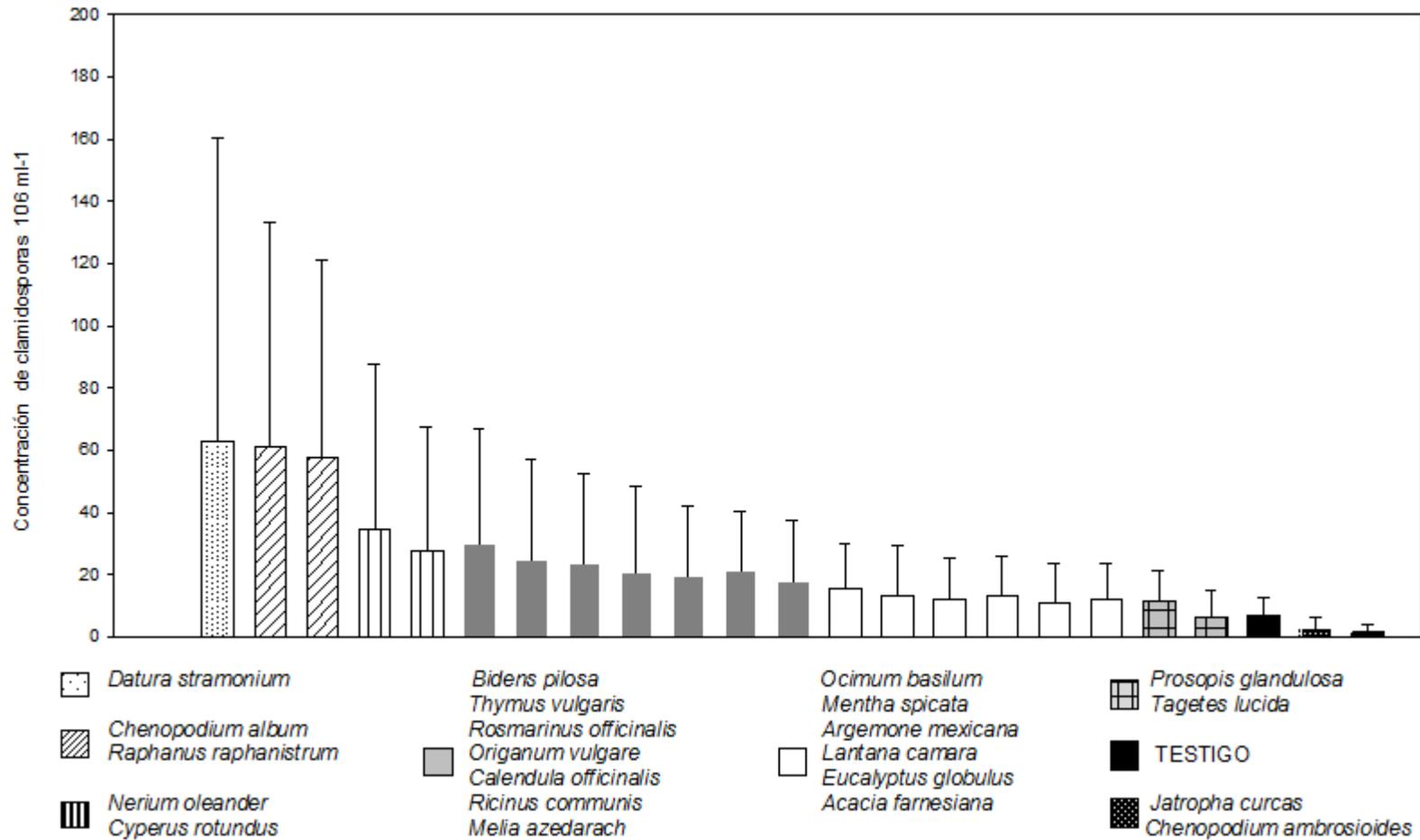


Figura 6. Media (\pm DE) de la producción de clamidosporas de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en presencia de extractos vegetales acuosos. ANOVA (Tukey, $P=0.05$). Diferentes literales significa diferencias entre tratamientos ($F=91.675$, $gl=5$, $P<0.001$) DE=desviación estándar.

Otra razón de las diferencias obtenidas en el comportamiento del hongo con los diferentes extractos puede atribuirse a las diferentes proporciones de materia orgánica aportadas por los extractos vegetales, ya que se sabe que la materia orgánica tiene una relación variable de carbono:nitrógeno dependiendo de la fuente de ésta (Chavarria-Carbajal *et al.*, 2001).

Los hongos requieren de una relación C:N que va de 7:1 a 25:1, es decir, necesitan concentraciones de carbono altas. En general los hongos son eficientes en la asimilación de nutrientes provenientes de fuentes ricas en carbono debido a la composición de su pared celular que está compuesta de quitina y melanina. (Wichen y Hafeel, 2004). Con estos datos pudieron descartarse dos de los tratamientos evaluados para la fase final de este trabajo: *Jatropha curcas* y *Chenopodium ambrosioides*.

6.3.1 Producción de clamidosporas de dos aislamientos de *P. c.* var. *chlamydosporia* en presencia de cinco extractos vegetales acuosos.

Según el análisis de varianza se encontraron diferencias entre tratamientos, siendo Pc341 en ambos medios de cultivo, con extracto de *Argemone mexicana* y *Datura stramonium* los tratamientos que estimularon en mayor proporción la producción de clamidosporas con relación al testigo. Los tratamientos en que hubo inhibición de la producción de clamidosporas fueron con el aislamiento de Pc10, en medio de cultivo Czapek y HMA con *R. raphanistrum* y *N. oleander* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Media de la concentración de clamidosporas de *P. c. var. chlamydosporia* en presencia de extractos vegetales acuosos. Literales distintas significa diferencias entre tratamientos.

TRATAMIENTO	MEDIA	CME
cazpek + PC341 + <i>Argemone mexicana</i>	31.3 a	1.202
HMA + PC341 + <i>Datura stramonium</i>	31.0 a	1.155
cazpek + PC10 + <i>Datura stramonium</i>	25.3 ab	2.186
HMA + PC341 + <i>Argemone mexicana</i>	22.7 b	2.603
cazpek + PC10 + <i>Argemone mexicana</i>	19.7 b	1.764
cazpek + PC341 + <i>Datura stramonium</i>	19.7 b	2.5
cazpek + PC341 + <i>Raphanus raphinistrum</i>	19.5 b	1.856
HMA + PC10 + <i>Datura stramonium</i>	19.0 b	1.155
HMA + PC10 + <i>Argemone mexicana</i>	19.0 b	1.732
HMA + PC341 + <i>Raphanus raphinistrum</i>	19.0 b	1.732
HMA + PC341 + <i>Nerium oleander</i>	15.3 bc	2.848
cazpek + PC341 + <i>Nerium oleander</i>	14.5 c	1.5
cazpek + PC10 TESTIGO	13.7 c	1.202
cazpek + PC341 TESTIGO	13.0 c	1.528
HMA + PC341 TESTIGO	12.3 cd	0.882
HMA + PC10 TESTIGO	10.7 d	1.453
cazpek + PC10 + <i>Raphanus raphinistrum</i>	10.0 d	1
cazpek + PC10 + <i>Nerium oleander</i>	9.0 d	1.732
HMA + PC10 + <i>Raphanus raphinistrum</i>	9.0 d	1.155
HMA + PC10 + <i>Nerium oleander</i>	5.7 e	0.882

CME= cuadrado medio del error (F=17.4, gl=2, $P < 0.01$).

Además se analizaron los resultados dependiendo del tratamiento, utilizando un análisis de varianza de dos vías, en donde las variables fueron el medio de cultivo y el extracto. Como resultado para el aislamiento Pc341 se encontraron diferencias entre los tratamientos (F=7.7, gl=2,19, $P < 0.001$) y que independientemente del medio de cultivo ya que no se encontró interacción entre los medios (F=0.15, gl=1,19, $P = 0.71$). Las diferencias son mayormente influenciadas por el extracto aplicado (F=72.07, gl=3,19, $P < 0.001$) (figura 7) siendo *D. stramonium* y *A. mexicana* los extractos que estimularon la producción de clamidosporas.

Pc341

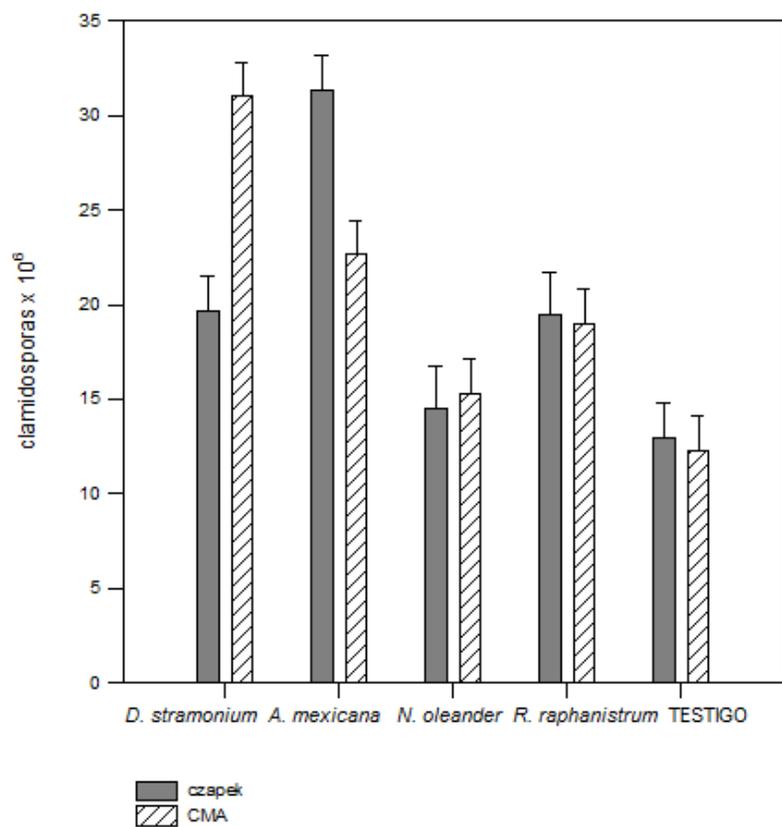


Figura 7. Media (\pm DE) de la producción de clamidosporas del aislamiento Pc341 DE= desviación estandar.

Pc10

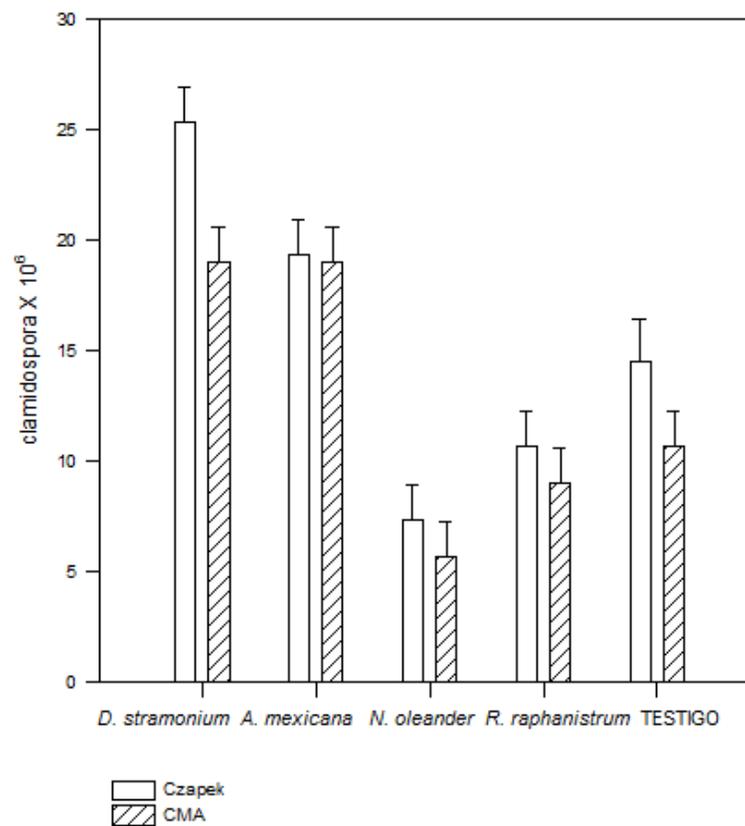


Figura 8. Media (\pm DE) de la producción de clamidosporas del aislamiento Pc10.

Para el aislamiento Pc10 si influyó el medio de cultivo utilizado ($F=7.19$, $gl=1,19$, $P=0.015$), aunque también influyó el extracto adicionado ($F=33.23$, $gl=3,19$, $P<0.001$) (Figura 8).

Es por eso que con los resultados obtenidos se debe considerar principalmente para el aislamiento Pc341 la posibilidad de combinarlo con *N. oleander* y *R. raphanistrum* ya que podría estar afectando el establecimiento y desarrollo del hongo en presencia de estos extractos en el suelo.

6.4 Efecto de los extractos vegetales acuosos sobre la movilidad de juveniles de segundo estadio de *Meloidogyne incognita*

Este ensayo nos mostró algunos de los diferentes efectos que pueden ocasionar los extractos vegetales acuosos, basados en estos efectos, los tratamientos se agruparon en tres grupos (cuadro 4).

Grupo 1: efecto nematocida, ya que no hay una recuperación de la movilidad posterior a la aplicación del tratamiento (figura 9), Este grupo muestra el efecto más deseable, ya que en condiciones de campo el efecto nematocida disminuiría la población del inóculo del nematodo y por tanto la infección sería menor.

Grupo 2. Efecto nematostático, aunque no es el más deseable en términos de recuperación del nematodo, puede resultar también de utilidad ya que al haber una pérdida temporal de la movilidad el nematodo, ésta puede afectar su eficiencia en localizar y penetrar al hospedante o hacerlo presa de enemigos naturales.

Finalmente el grupo 3. Lo conforman los extractos que se comportaron en forma similar al testigo.

Una de la plantas probadas en este trabajo con efecto nematocida es *Thymus vulgaris* la cual contiene timol del que se conoce que tiene actividad nematocida contra *Meloidogyne* spp. (Soler-Serratos et al., 1996).

Otro caso es el de Pérez et al. (2003) que realizaron un trabajo en el que observaron que es posible reducir la tasa de reproducción de *Meloidogyne* tanto en *in vitro* como en condiciones de invernadero al evaluar incorporar enmiendas

orgánicas elaboradas con algunos miembros de la familia Asteraceae entre ellas *C. officinalis* al lograr un efecto nematicida.

Cuadro 4. Media del porcentaje de J2 móviles de *Meloidogyne incognita* por la adición de 22 extractos vegetales acuosos, en cinco diferentes tiempos.

TRATAMIENTO	1hr	3hr	12hr	36hr	72hr
TESTIGO	100	100	100	100	74.92
Grupo 1: EFECTO NEMATICIDA					
<i>Thymus vulgaris</i>	100	51.58	51.58	0.00	0.00
<i>Raphanus raphanistrum</i>	100	40.13	36.00	22.00	8.00
<i>Calendula officinalis</i>	100	100	39.78	17.27	16.57
<i>Chenopodium álbum</i>	42.44	15.60	11.30	3.80	0.00
Grupo 2: EFECTO NEMATOSTÁTICO					
<i>Acacia farnesiana</i>	66.38	36.80	66.98	28.08	74.00
<i>Argemone mexicana</i>	100	100	19.08	80.00	54.40
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	100	25.00	68.29	20.73	0.80
<i>Cyperus rotundus</i>	100	100	14.31	86.32	67.53
<i>Datura stramonium</i>	100	97.60	43.95	100	71.75
<i>Eucalyptus globulus</i>	100	91.49	41.67	94.11	30.87
<i>Jatropha curcas</i>	100	96.40	13.20	83.78	62.57
<i>Melia azedarach</i>	100	100	32.80	97.83	65.88
<i>Mentha spicata</i>	100	99.20	43.03	97.83	61.85
<i>Nerium oleander</i>	100	60.03	66.39	75.04	67.98
<i>Ocimum basilicum</i>	100	13.00	55.49	97.60	53.58
<i>Prosopis glandulosa</i>	100	15.56	2.40	72.80	67.97
<i>Ricinus communis</i>	100	8.52	8.52	47.00	57.20
Grupo 3: SIN EFECTO					
<i>Bidens pilosa</i>	100	100	68.85	97.20	62.40
<i>Lantana camara</i>	81.80	98.00	84.47	64.10	54.86
<i>Origanum vulgare</i>	100	100	79.05	64.10	60.73
<i>Rosmarinus officinalis</i>	100	100	100	64.10	74.64
<i>Tagetes lucida</i>	100	100	100	96.81	64.59

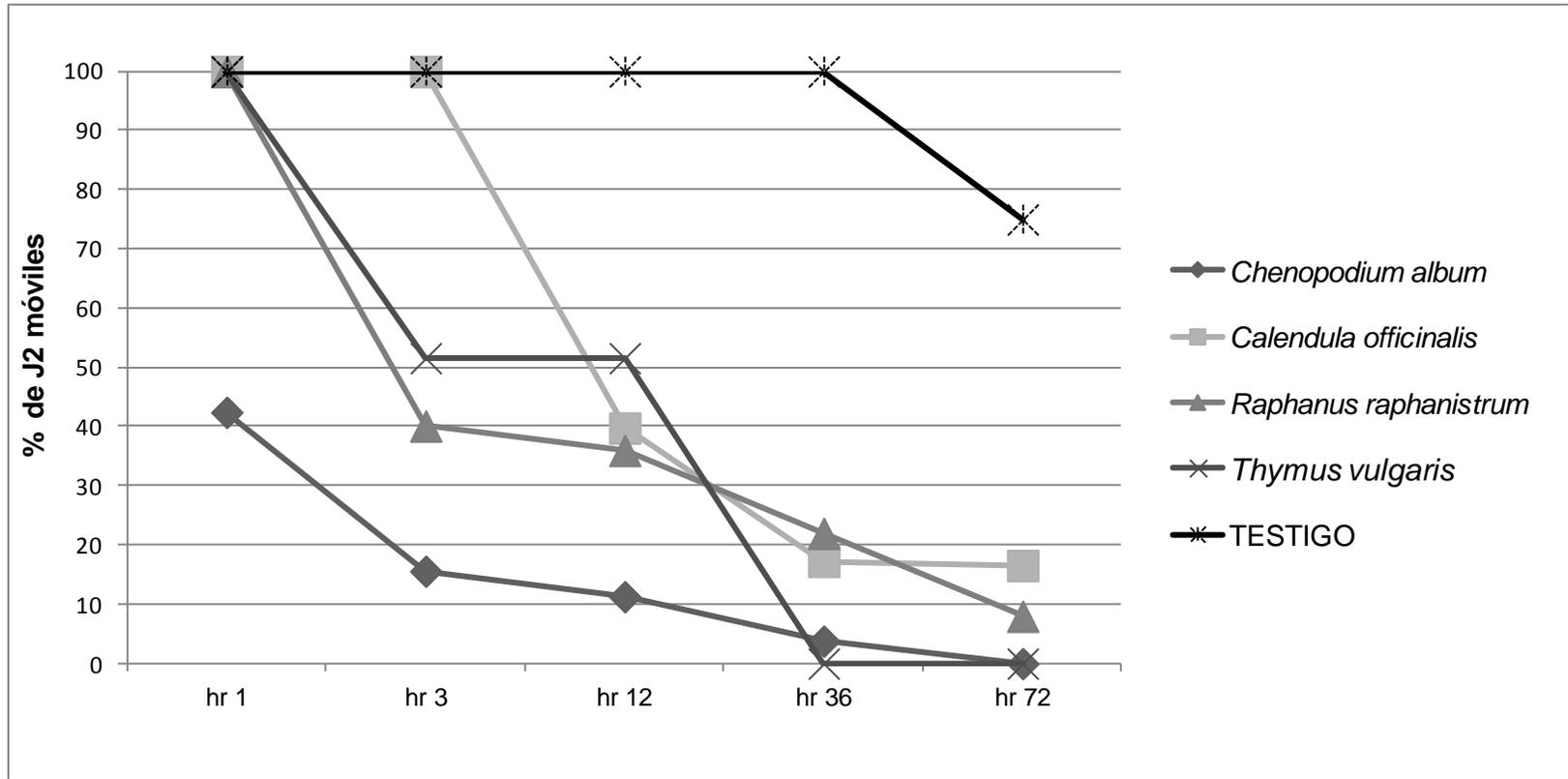


Figura 9. Efecto nematocida de extractos vegetales acuosos sobre la movilidad de juveniles de segundo estadio de *Meloidogyne incognita*.

Ejemplo que confirma el efecto logrado en este trabajo son los resultados obtenidos por Gamal *et al.* (2008) en el que al evaluar 27 plantas, observaron que al agregar 500ppm de extractos metanólicos y hexánicos de éstas, 11 de las plantas lograron un efecto nematicida por arriba del 80%, entre ese grupo de plantas se encuentran *Chenopodium* (hojas) y las semillas de *Argemone mexicana* y *Datura stramonium*.

Es importante considerar que en trabajos publicados por diversos autores sobre este tema, las partes de las plantas con propiedades contra nematodos utilizadas, así como extractos fueron procesados de diferente forma. Un ejemplo es lo reportado por Cristóbal-Alejo *et al.* (2006) quienes probaron el efecto de extractos etanólicos de 55 plantas yucatecas a diferentes concentraciones y provenientes de diferentes partes de la planta, sobre la movilidad de J2 y eclosión de *M. incognita*, encontrando que el efecto está influenciado tanto por la concentración del tratamiento como por la parte de la planta utilizada y en su trabajo los extractos de las hojas de *Eugenia winzerlingii* fueron los que lograron mayor porcentaje de mortalidad.

Uno de los compuestos que están presentes comúnmente en la mayoría de enmiendas orgánicas es el amonio, el cual se produce durante el proceso de descomposición de material vegetal (Hobbs *et al.*, 1999), a lo que se puede atribuir el efecto en la movilidad del nematodo, ya que recordemos que la cutícula del nematodo contiene una capa proteica semipermeable que puede ser degradada por diversos compuestos y esto afectar la fisiología del nematodo.

Observando los resultados obtenidos en este ensayo y los antecedentes de otros ensayos vemos que la diferencia en los efectos de las plantas sobre los J2 de *Meloidogyne incognita* pueden ser variables, ya sea por la forma de aplicación, el tiempo de exposición con el tratamiento, la concentración y al complejo de compuestos presente en cada uno de los extractos.

Una razón probable de los extractos que no dieron resultados es, que aunque son plantas con propiedades contra nematodos, no tienen acción sobre la población de *M. incognita* que se probaron; ya que se sabe que el ambiente influye en la calidad

y cantidad de los aleloquímicos, así como la temperatura, humedad y otros factores que pueden permitir o no que los compuestos entren en contacto con los nematodos o bien puede haber requerimientos especiales meteorológicos para que se inicie la síntesis de compuestos aleloquímicos (Halbrendt, 1996).

6.5 Parasitismo de huevos de *Meloidogyne incognita* por *P. c. var. chlamydosporia* en presencia de extractos vegetales acuosos en medio sólido.

Se obtuvieron diferencias estadísticas, en donde se observó que sólo *C. album*, *N. oleander* y *T. lucida* no afectan a *P. c. var. chlamydosporia* en su capacidad de parasitar los huevos de *M. incognita*, ya que el porcentaje de parasitismo se mantuvo por arriba del 80%, a diferencia de *A. mexicana*, *R. raphanistrum*, *D. stramonium* y *C. rotundus* que parasitaron entre el 70 y 79% de los huevos, el resto de los tratamientos estuvieron por debajo del 69% de parasitismo (Figura 10).

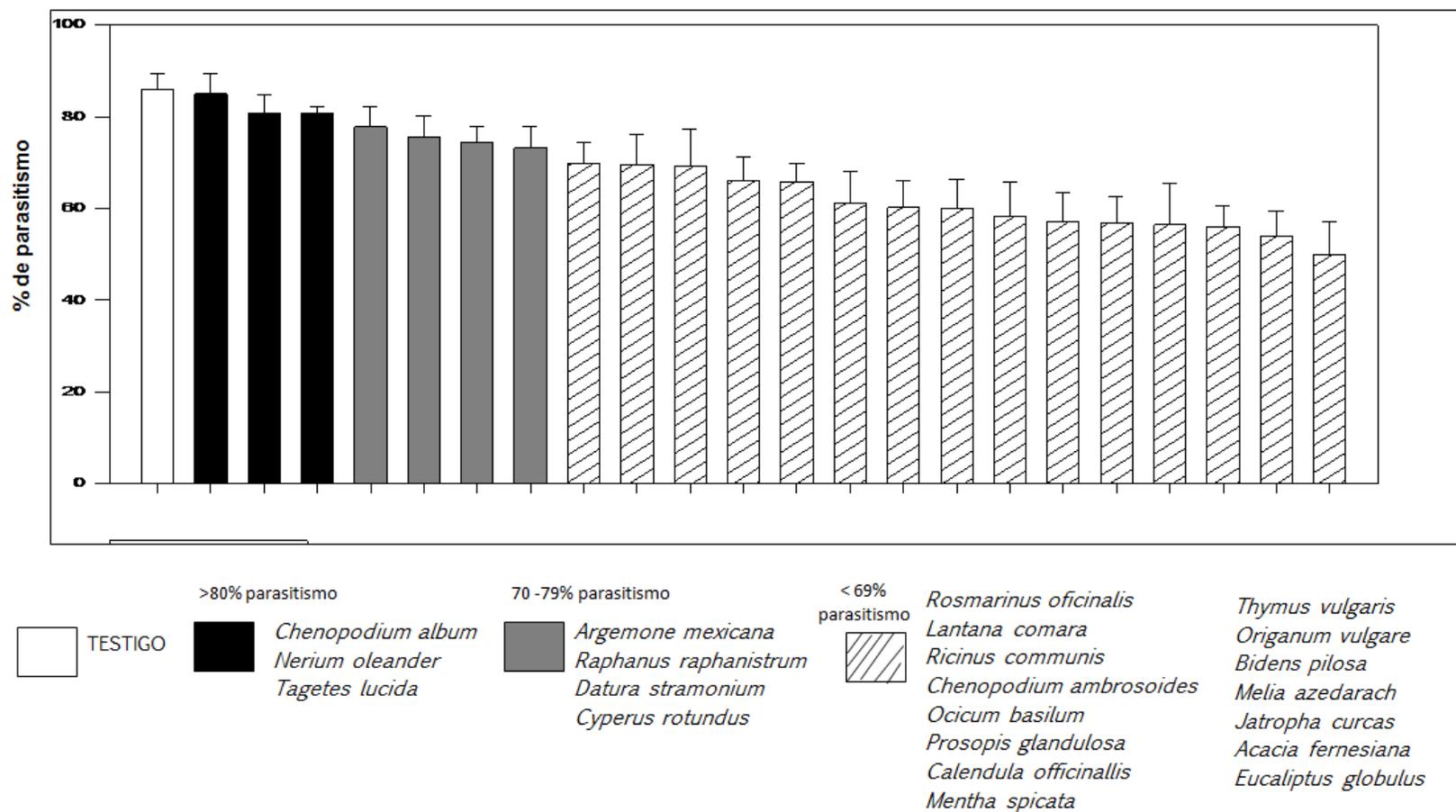


Figura 10. Media del porcentaje de parasitismo de huevos de *M. incognita* en presencia de extractos vegetales acuosos. ANOVA (Tukey $P=0.05$) A-A. ($F= 17.7$, $gl=4$, $P<0.001$), literales distintas significa diferencia entre tratamientos.

Se sabe que los hongos nematófagos están provistos de enzimas capaces de degradar la capa proteica del nematodo para poder parasitarlo y digerirlo (Peteira *et al.*, 2006). Para acceder a su fuente de alimentación en el interior del huevo del nematodo y de forma general por el modo de nutrición de los hongos, *P. c. var. chlamydosporia* debe secretar enzimas extracelulares que le permitan degradar los sustratos complejos a formas más simples que puedan ser metabolizadas (Lopez-Llorca *et al.*, 2002).

También se sabe que existen compuestos en las plantas con la capacidad de modificar procesos metabólicos de algunos hongos (Montes-Belmont y Flores-Moctezuma, 2011), lo que de alguna manera podría modificar la fisiología de *P. chlamydosporia* y afectar la capacidad de producir las enzimas encargadas de degradar la capa proteica de la que está provisto el huevo de *M. incognita*.

Esto también tomando en cuenta trabajos realizados como el de Khan y Saxen (1997) en el que la integración de material orgánico modificó la capacidad de parasitar huevos del hongo nematófago *Paecilomyces* al incorporar al suelo enmiendas orgánicas para control de *Meloidogyne* sp.

Así también se ha argumentado que el contenido de nutrientes del material orgánico está estrechamente ligado a la capacidad del hongo para modificar su potencial parasítico (Morton *et al.*, 2004).

Dados los resultados obtenidos en el presente trabajo, es de suma importancia contemplar el efecto de los extractos sobre el parasitismo de *P. c. var. chlamydosporia* sobre los huevos de *M. incognita* ya que es en este efecto que está basada la posibilidad de control del patógeno, es por eso que en este caso deben elegirse para experimentos futuros sólo los extractos que no afecten el parasitismo o bien que reduzcan lo menor posible el porcentaje de parasitismo.

6.5.1 Porcentaje de parasitismo de huevos de *Meloidogyne incognita* por *P. c. var. chlamydosporia* en presencia de extractos vegetales acuosos en medio nutritivo líquido.

En el ANOVA realizado, tomando como variables el tiempo en el que se efectuó la toma de los datos, el tratamiento vegetal y el aislamiento, se encontraron diferencias debido a la interacción de éstas ($F=5.33$, $gl=1, 6, 1$ $P<0.001$).

También se encontraron diferencias atribuidas al tiempo para cada uno de los tratamientos (LSD 0.05=3.74). Al comparar los tratamientos entre sí se encontraron diferencias significativas (LSD 0.05= 4.02) (Figura 11).

Como podemos observar ambos aislamientos de *P. chlamydosporia* se vieron afectados por los extractos vegetales en su capacidad de parasitar los huevos de *M. incognita*. El extracto que inhibió en mayor medida el porcentaje de parasitismo en ambos aislamientos fue la muestra con origen africano de *Crotalaria* sp.

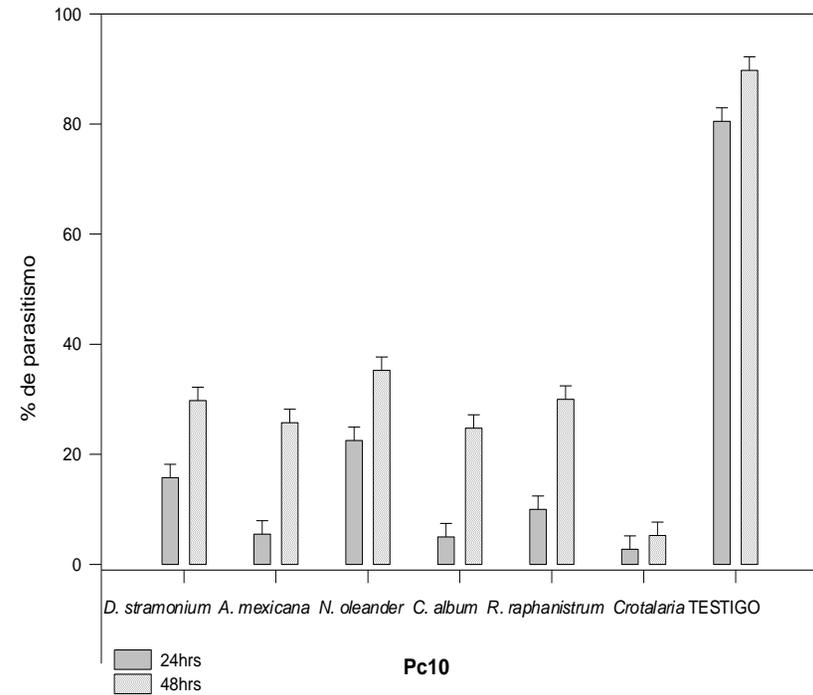
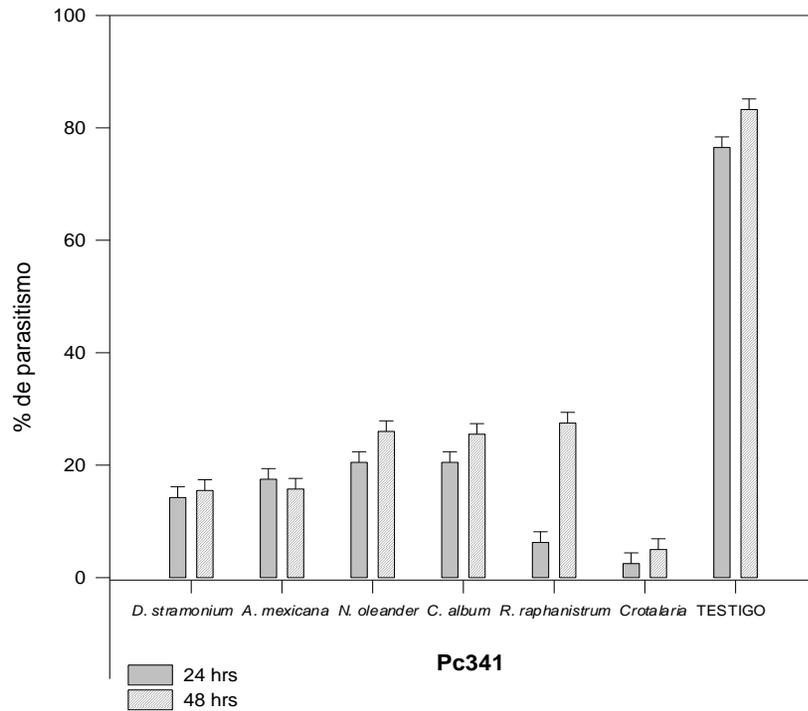


Figura 11. Media del porcentaje de parasitismo de huevos de *P. c.* var. *chlamydosporia* aislamientos Pc341 y Pc10 sobre huevos de *M. incognita* en medio de extracto de levadura (EL).

En ningún tratamiento se inhibió en su totalidad la capacidad de parasitar, además se observó que el parasitismo es modificado por el tiempo de exposición al tratamiento ya que en tratamientos como *R. raphanistrum* aunque en las primeras 24hrs el parasitismo es notoriamente inhibido, a las 48hrs se recupera, principalmente en el aislamiento Pc341. Respecto a diferencias entre los aislamientos el Pc10 fue mayormente afectado al inhibirse en mayor proporción el porcentaje de parasitismo a las 24hrs y con una notoria la recuperación a las 48hrs posterior a la aplicación de los tratamientos.

6.5.2 Porcentaje de parasitismo de *P. c. var. chlamydosporia* sobre huevos de *Meloidogyne incognita* en presencia de los extractos vegetales acuosos en suelo

Al igual que en el experimento anterior, no hubo necesidad de transformar los datos, ya que pasaron la prueba de igualdad de la varianza ($P=0.198$) y la normalidad ($P=0.126$).

Se encontraron diferencias por efecto del aislamiento ($F=17.3$, $gl=1, 5$; $P<0.01$) aunque las diferencias más notorias son por efecto del tratamiento de extracto vegetal ($F=39.34$, $gl=5$, $P=<0.01$).

Los tratamientos superaron en porcentaje de parasitismo al control, a excepción del aislamiento Pc10 con tratamiento de *R. raphanistrum* que se comportó estadísticamente similar al control. Los tratamientos que promovieron el porcentaje de parasitismo en ambos aislamientos fueron *D. stramonium* y *A. mexicana* (Figura 12).

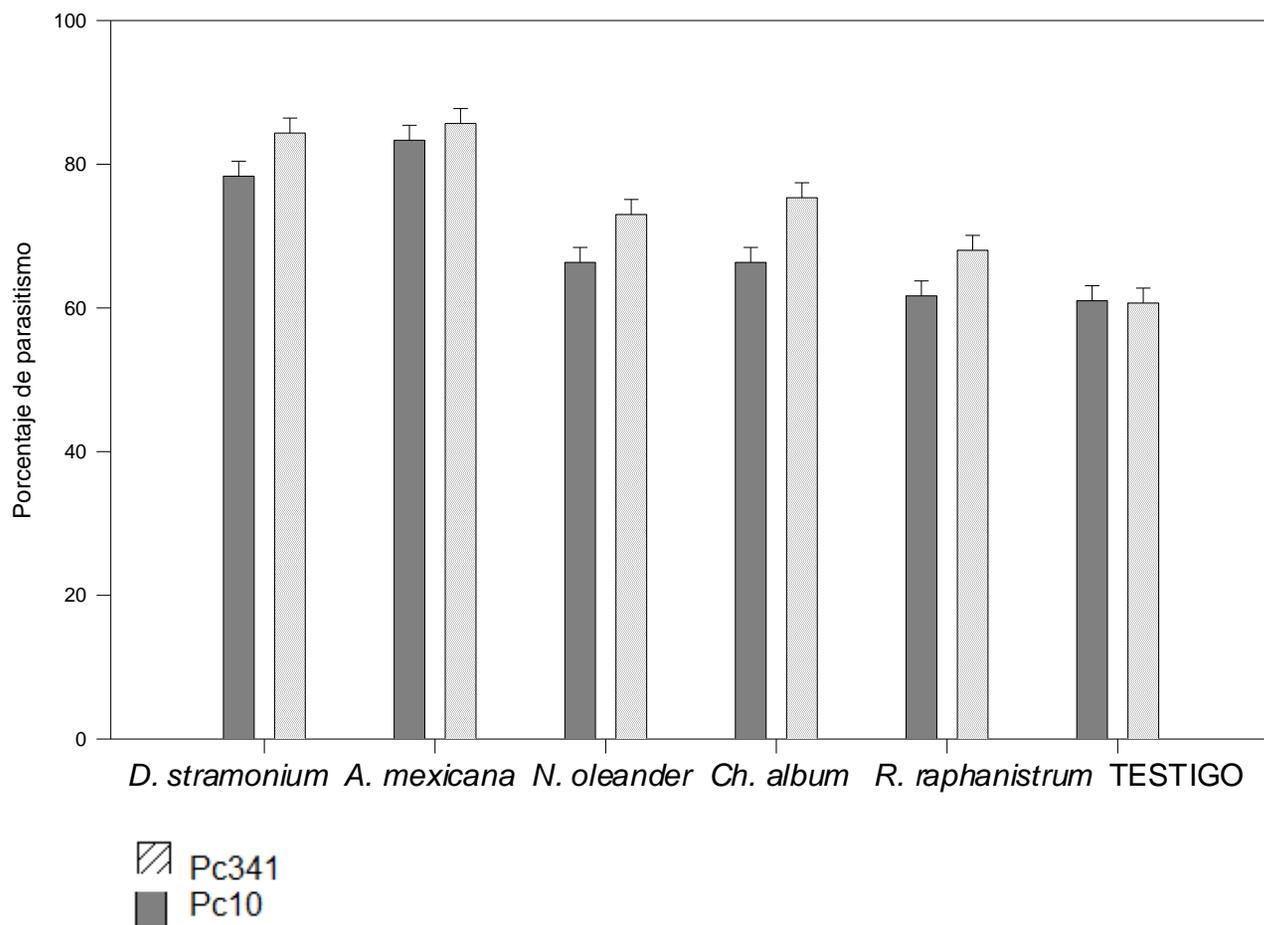


Figura 12. Porcentaje de parasitismo de huevos de *Meloidogyne incognita* por los aislamientos Pc10 y Pc341 de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en suelo estéril con extractos vegetales añadidos.

Observando los resultados de los ensayos anteriores podemos afirmar que los extractos vegetales afectan la actividad parasítica y concretamente, respecto a los ensayos en EL y placas de A-A puede favorecerse el criterio que mencionaron Kerry y Bourne (1996) que al parecer el exceso de carbono (nutrientes) inhibe la producción de enzimas implicadas en el proceso de infección. Relacionado con este fenómeno, se sabe que la adición de enmiendas orgánicas al suelo puede apoyar en gran medida el aumento en las densidades del hongo, o bien inhibir el parasitismo sobre los nematodos.

Como se mencionó antes, la relación carbono:nitrógeno es importante para el desarrollo de hongos y además que la descomposición de la materia orgánica añadida al suelo con una relación C:N alta puede tener como resultado la liberación de sustancias tóxicas como son los fenoles, los cuales pueden tener actividad fungicida y/o nematicida (Oka *et al.*, 2007).

Los resultados de los experimentos anteriores coinciden con los resultados del trabajo realizado por Luambano-Nyoni (2009) en el que atribuyen la disminución del porcentaje de parasitismo de huevos de *Meloidogyne sp.* por *P. chlamydosporia* a una relación de carbono alta en comparación a la concentración de nitrógeno.

6.6 Efecto de polvos seleccionados, solos y en combinación con *P. c. var. Chlamydosporia*, sobre plantas de frijol en suelo infestado con *Meloidogyne incognita*

Respecto a la producción de ejote, los resultados no mostraron diferencias estadísticas entre tratamientos ($F=1.09$, $gl=7$, $P=0.39$), aunque al realizar un segundo ANOVA, esta vez de dos vías, tomando factores el tratamiento y la posición en la hilera en que se encontraba la unidad experimental, si se encontraron diferencias, pero éstas no se atribuyeron al tratamiento ($F=13.54$, $gl=7,1$; $P<0.001$), la explicación de este fenómeno se la atribuye principalmente a un exceso de radiación en algunos de las unidades en las que la producción se vio disminuida.

Además debe considerarse que las plantas de frijol no llevaron tareas de manejo agrícola a excepción del tratamiento y riego cada tercer día, lo que pudo haber provocado la baja producción de ejote.

Los resultados obtenidos que nos permitieron observar un efecto de los tratamientos fue el índice de agallamiento ($H=63.1$, $gl=7$, $P<0.001$), siendo el nematicida (carbofuran) y la incorporación de los polvos de los tres vegetales junto con *P. c. var. chlamydosporia* los tratamientos que redujeron en mayor medida el índice de agallamiento con respecto al testigo, el cual mostró un agallamiento de 6 a 8 (Anexo 7) similar al de las raíces que fueron utilizadas para inocular el suelo o sustrato utilizado en este experimento. Se observó que en el caso de *T. vulgaris*, al incorporar *P. c. var. chlamydosporia*, se disminuyó significativamente el agallamiento a diferencia de *C. album* y *R. raphanistrum* en los que no hubo ese efecto (Figura 13).

El efecto de los diferentes tratamientos sobre el principal síntoma (agallamiento) de daño de *M. incognita*, nos muestra que puede haber un beneficio en la reducción del agallamiento por la aplicación de polvo de plantas con propiedades contra nematodos, y este efecto podría ser atribuido a sus propiedades químicas (Chitwood, 2002) o bien al enriquecer el suelo para la planta y promover el establecimiento de organismos antagonistas a *Meloidogyne* sp. (Eisenback y Griffin, 1987; Stirling, 1991). Los resultados aquí obtenidos confirman el efecto nematicida de las 3 plantas probadas in vitro (Cuadro 4); no obstante, parece haber un efecto sinérgico al combinarlas entre si y con el hongo *P. c. var. chlamydosporia*. Si hablamos del papel antagonista de *P. c. var. chlamydosporia* ante *Meloidogyne*, el hongo es entonces potencialmente capaz de reducir el índice de agallamiento ocasionado por este patógeno en el largo plazo y después de varios ciclos de cultivo al destruir los huevos del nematodo y reducir sus niveles de inóculo en el suelo (Eapen *et al.*, 2009; Stirling y Smith, 1998; Viaene y Abawi, 2000), aunque se le atribuyen mejores resultados a partir del segundo ciclo del cultivo después de haber aplicado el hongo (Hernández e Hidalgo-Díaz, 2008).

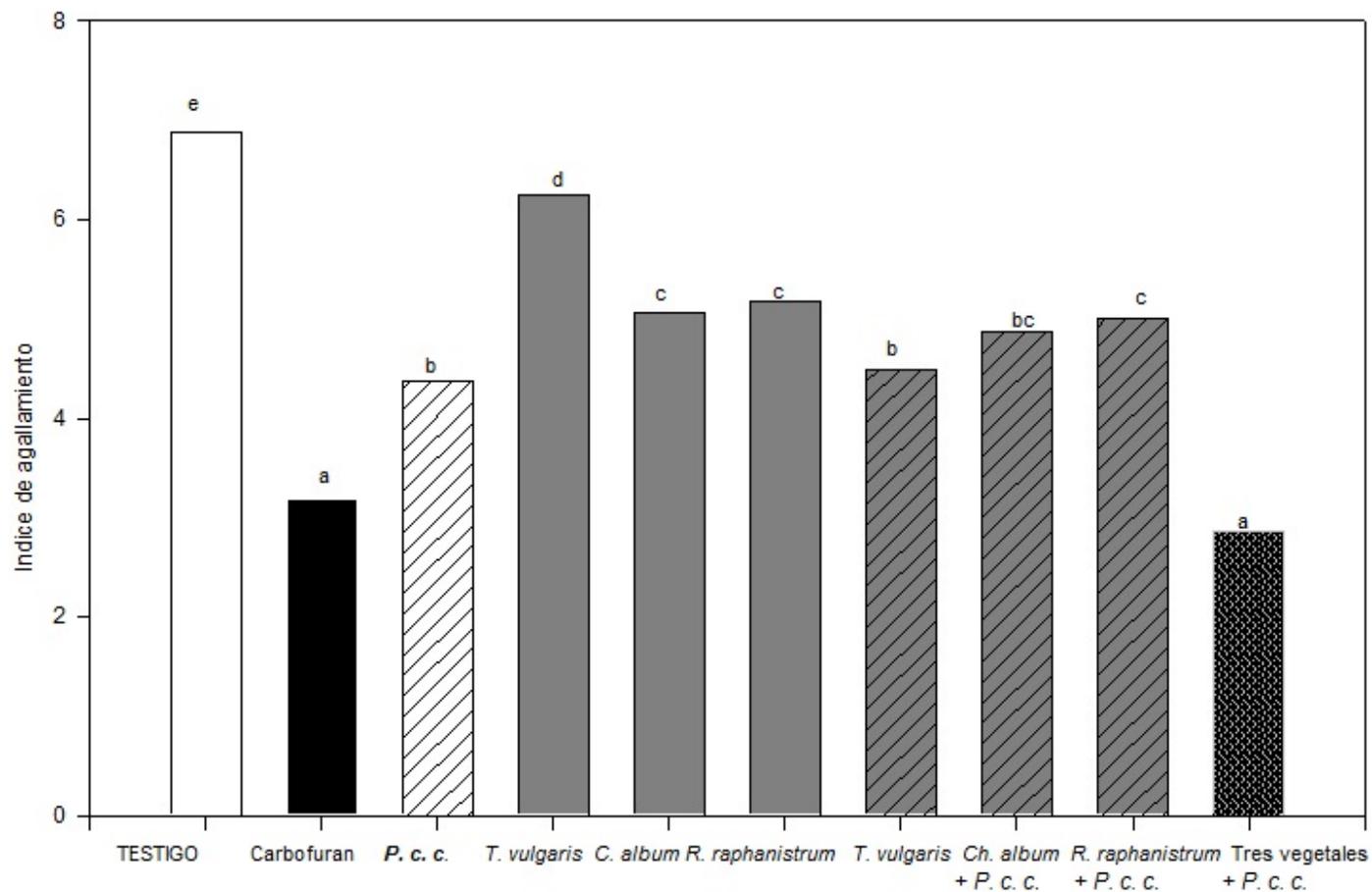


Figura 13. Medianas del Índice de agallamiento por efecto de la incorporación de polvos vegetales y *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Los vegetales incluidos en la última columna son los tratamientos *Chenopodium album*, *Raphanus raphanistrum* y *Thymus vulgaris*, P.c.c. = *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Diferentes literales indican diferencias entre tratamientos.

Ya que para incorporar a *P. c. var. chlamydosporia* se utilizó arroz colonizado, algunos autores dudan en atribuir el efecto sobre el índice de agallamiento solo al hongo debido a la estimulación de las actividades en la microflora del suelo provocado por la materia orgánica añadida, aunado a que la incorporación de los polvos vegetales con propiedades contra nematodos son un aporte extra de materia orgánica (Rodríguez-Kábana, 1991); ya que se sabe que al adicionar materia orgánica al suelo se promueve el crecimiento de *P. chlamydosporia* aunque se vea disminuida la capacidad parasítica debido a la disposición de nutrientes para el hongo (Jaffee, 2001). Entonces que se propone que los polvos vegetales de las plantas evaluadas (y a la materia orgánica que los constituye) pueden promover el desarrollo y establecimiento en el suelo de *P. c. var. chlamydosporia* para mejorar la capacidad de control de *M. incognita* en el siguiente ciclo agrícola.

Un ejemplo de resultados similares a los de este trabajo son los obtenidos por Dhawan S.C. y Singh Satyendra (2009), en el que obtuvieron una reducción del índice de agallamiento en plantas de okra por *Meloidogyne incognita* al incorporar carbofuran y *Pochonia chlamydosporiaso*, resultados que pueden equipararse en nuestro caso al combinar la aplicación de *P. c. var. chlamydosporia* y la mezcla de los tres vegetales, con el beneficio adicional que no se usaron químicos y el costo es potencialmente más bajo.

Otro caso es el trabajo en invernadero con suelo infestado con *Nacobbus aberrans*, en el que a las plantas las que se les incorporó vermicomposta sola o en combinación con otra táctica, una de las cuales fue *P. c. var. chlamydosporia* y otra el nematicida carbofuran, presentaron las menores poblaciones de juveniles (J3 y J4) y hembras maduras g-1 de raíz, así como mayor biomasa y menor índice de agallamiento en comparación con los tratamientos sin vermicomposta (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2010). Éste hecho apoya los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que al incorporar los polvos vegetales, junto con *P.c. var. chamydsporia* se eficientó la capacidad de reducir el daño hecho por *Meloidogyne incognita*.

Es importante recalcar que es la primera vez que se realiza un trabajo en el que se propone la aplicación de *P. c. var c.* y polvos vegetales, estos último aplicados de una forma sencilla y prácticamente artesanal.

Se sabe que las principales barreras con las que se encuentran los productos formulados a base de microorganismos son: 1) Una efectividad de control en general menor que los productos químicos. 2) Generalmente su acción no es inmediata. 3) Dificultades de producción a nivel comercial. 4) Necesidad de resolver problemas técnicos como la sensibilidad a factores ambientales (temperatura, radiación UV, humedad) que presentan la mayoría de estos productos (Boyetchko et al., 1998; Glass, 1995; Lumsden *et al.*, 1995; Striling, 1991). Es entonces que los resultados obtenidos solucionan al menos los dos primeros aspectos, ya que los resultados de la combinación del hongo y los tres vegetales con el hongo mostraron efecto similar al nematocida químico, además los resultados en cuanto a la reducción del daño fueron inmediatos.

7. CONCLUSIONES

Se identificó a *Meloidogyne incognita* como la causante de las agallas en raíz, de plantas de jitomate provenientes del municipio de Xochitepec, Morelos.

No se encontró modificación en el desarrollo de plantas de frijol, provocadas por los polvos de las 22 plantas consideradas con propiedades contra nematodos a una concentración acuosa del 1%.

Un total de 20 extractos vegetales acuosos probados no afectan el crecimiento micelial del hongo *P. c. var. chlamydosporia*.

Los extractos de *C. officinalis* y *Ch. ambrosioides* inhiben el crecimiento micelial de *P. c. var. chlamydosporia*.

La producción de clamidosporas de *P. c. var. chlamydosporia* puede ser estimulada al añadir extracto vegetal acuoso de cada una de las 20 plantas que crecen naturalmente en el estado de Morelos, México.

Los extractos vegetales acuosos de *Datura stramonium*, seguidos de los de *Chenopodium album* y *Raphanus raphanistrum*, estimulan de manera significativa la producción de clamidosporas del hongo *P. c. var. chlamydosporia*.

Los extractos vegetales acuosos de *Jatropha curcas* y *Chenopodium ambrosioides* inhiben la producción de clamidosporas de *P. c. var. chlamydosporia*.

De los dos aislamientos evaluados respecto a la producción de clamidosporas en presencia de extractos vegetales acuosos, solo *N. oleander* provocó inhibición en el aislamiento Pc10 de *P. c. var. chlamydosporia*.

Los extractos vegetales de 17 de las 22 plantas colectadas en el estado de Morelos tienen la capacidad de provocar efectos nematocidas o nematostáticos sobre juveniles de segundo estadio (J2) de *Meloidogyne incognita*.

Los extractos vegetales acuosos de *Chenopodium album*, *Calendula officinalis*, *Raphanus raphanistrum* y *Thymus vulgaris* tienen un efecto nematocida sobre los J2 de *M. incognita*.

Al añadir extractos vegetales acuosos en medio de cultivo sólido, 19 de las 22 de ellos disminuyeron el porcentaje de parasitismo de huevos de *M. incognita* por *P. c. var. chlamydosporia*.

En medio nutritivo líquido, los extractos acuosos de las cinco plantas evaluadas inhibieron de forma significativa el porcentaje de parasitismo de huevos de *M. incognita* por *P. c. var. chlamydosporia*.

El porcentaje de parasitismo de huevos de *M. incognita* por *P. c. var. chlamydosporia* se incrementa al añadir extracto acuoso de, *Argemone mexicana*, *Chenopodium album*, *Datura stramonium*, *N. oleander* y *R. raphanistrum* en suelo estéril.

Los polvos de *Thymus vulgaris*, *Calendula officinalis* y *Chenopodium album* añadidos individualmente al suelo son capaces de reducir el índice de agallamiento de raíces de frijol provocadas por *Meloidogyne incognita* a nivel invernadero.

Al incorporar la mezcla de polvos de *Thymus vulgaris*, *Calendula officinalis* y *Chenopodium album* junto con el hongo *P. c. var. chlamydosporia* al suelo se logra un efecto similar en el índice de agallamiento en raíces de frijol sembradas en invernadero al que se obtiene al añadir nematicida carbofuran.

8. PERSPECTIVAS

Ya que se logró una efectividad de control similar a la lograda por un nematocida químico y se obtuvieron resultados inmediatos, con la adición de *Ch. album*, *R. raphanistrum* y *T. vulgaris* junto con *P. c. var. chlamydosporia*, restaría superar las dificultades de la producción a nivel comercial del hongo y los polvos vegetales, esto para resolver problemas técnicos, como la sensibilidad a factores ambientales (temperatura, radiación UV, humedad) que presentan, por lo que es conveniente identificar las sustancias de los vegetales que actúan tanto sobre el hongo como el nematodo.

Además es necesario continuar el experimento en invernadero al menos por un ciclo agrícola más, esto para corroborar la permanencia del hongo *P. c. var. chlamydosporia* en el suelo y también confirmar que los efectos de control pueden mejorar a lo largo de consecuentes ciclos agrícolas.

9. LITERATURA CITADA

- Adegbite, A.A. and Adesiyun, S.O. 2005. Root extracts of plants to control root-knot nematode on edible soybean. *World Journal of Agricultural Sciences*. 1(1):18-21.
- Altieri, M. A. and J. D. Doll. 1978. The potential of allelopathy as a tool for weed management in crop fields. *Pans* 24(4): 495-502.
- Avila, A., Murillo, W., Durango, E., Torres, F., Quiñones, W. y Echeverri, F. 2007. Efectos alelopáticos diferenciales de extractos de eucalipto. *Scientia Et Technica* 33: 203-204.
- Ayala, J.P. 2006. La evolución de un evolucionista. Universitat de Valencia, España. 225 p.
- Barron, G.L. 1977. The nematode destroying fungi. *Topics in Mycology*, Canadian Biological Publications Ltd., Canada. no. 1. Pp. 1-140.
- Bauske, E.M., Rodríguez-Kábana, R., Estaun, V., Kloepper, J.W. and Robertson, D.G. 1994. Management of *Meloidogyne incognita* on cotton by use of botanical aromatic compounds. *Nematropica* 24: 143-150.
- Bharadwaj, A. and Sharma, S. 2007. Effect of some plant extracts on the hatch of *Meloidogyne incognita* eggs. *International Journal of Botany* 3: 312-316.
- Bijloo, J.D. 1965. The "Pisum" test: a simple method for the screening of substances on their therapeutic nematocidal activity. *Nematologica* 11: 643-44.
- Bourne, J.M., Kerry, B.R. and De Leji, F.A.A.M. 1994. Methods for the study of *Verticillium chlamyosporium* on the rhizosphere. Supplement to *Journal of Nematology* 26: 587-591.

- Boyetchko, S., Pedersen, E., Punja, Z., Reddy, M. 1998. Formulations of Biopesticides. Hall F.R. & Barry J.W. Editores in Methods in Biotechnology. Humana Press, Totowa, NJ. 5. 487-508.
- Byrd, D.C., Kirkpatrick, T. Jr. and Barker, K.R. 1983. An improved technique for cleaning and staining plant tissue for detection of nematodes. Journal of Nematology.15: 142–143.
- Cardona, C., Flor, C.A., Morales, F.J. y Pastor Corrales, M. 1982. Problemas de campo en los cultivos de frijol en América Latina. 2ª ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, 100 p.
- Cid del Prado, I., Tovar, S.A. y Alfonsina, H.J. 2001. Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 32-39.
- Chavarria-Carbajal, J.A., Rodríguez-Kábana, R., Klopeer, W.J. and Morgan-Jones, G. 2001. Changes in populations of microorganisms associated with organic amendments and benzaldehyde to control plant-parasitic nematodes. Nematropica 31: 165-180.
- Chitwood, D.J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annual Review of Phytopathology 40: 221–49.
- Chiwood, D. and Lusby, W. 1991. Metabolism of plant sterol by nematodes. Lipids 26: 619-627.
- Choi, I.H., Kim, C.S. Shin, S.C. and Park, I.K. 2007. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Russian Journal of Nematology 15: 35-40.
- Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J.M., Moguel-Catzín, S., Marbán-Mendoza, N., Medina-Baizabal, L., Simá-Polanco, P., Peraza-Sánchez, S.R. and Gamboa-Angulo, M.M. 2006. Sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yucatecan plants. Nematropica 36:89-97.

- Coyne, D.L., Nicol, J.M. and Claudius-Cole, B. 2007. Practical plant nematology: a field and laboratory guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.
- Curtis, M.C., Robinson, A.F. and Perry, R.N. 2009. Chapter 6: Hatch and Host location. In Root- Knot Nematodes (Eds. Perry, R.N., Moens, M. and Starr J.L.). CABI, U.K., pp. 139-163.
- De Leij, F.A.A.M. and Kerry B.R. 1991. The nematophagus fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard, as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. *Revue de Nématologie* 14:157-164.
- Deacon, J.W. 1997. *Modern Mycology*. Third edition. Blackwell Science, Oxford, U.K., 303 pp.
- Desjardins A.E, McCormick S.P. Plaisted R.L and Brodie B.B. 1997. Association between solanetivone production and resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45: 23–26.
- De Waele, D. and Elsen, A. 2007. Challenges in tropical plant nematology. *Annual review of Phytopatology* 45:457-485.
- DGAPE y AS, Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. 2009. <<http://w %20FRIJOL.pdf>> [última consulta 27 de Agosto del 2011]
- Dhawan S.C.y Singh Satyendra (2009). Compatibility of *Pochonia chlamydosporia* with Nematicide and Neem Cake against Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* Infesting Okra. *Indian Journal of Nematology* 39 (1): 87-89
- Duke, J. 2008. Phytochemical data base. <http://www.ars-grin.gov/duke>
- Eapen, J.A., Beena, B. and Ramana, K.V. 2009. Field evaluation of *Trichoderma harzianum*, *Pochonia chlamydosporia* and *Pasteuria penetrans* in a root knot nematode infested black pepper (*Piper nigrum* L.) garden in India. *Journal of Plantation Crops* 37: 196-200.

- Eisenback, J.D.A. and Griffin, G.D. (1987). Interactions with other nematodes. In: J.A. Veech and G.W. Dickson (Eds.). *Vistas on Nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville, MD, USA., pp. 313-320.
- Evans A.F. and Perry R.N. 2009. Chapter 9: Survival Mechanism. In *Root- Knot Nematodes* (Eds. Perry, R.N., Moens, M. and Starr, J.L.). CABI, U.K., pp. 201-213.
- Fahey, J.W., Zalemann, A.T. and Talalay, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinonates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5-51.
- Ferris, H. and Zheng L. 1999. Plant sources of Chinese herbal remedies: Effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 31: 241-263.
- Flores-Camacho, R., Bourne, J.M., Cid del Prado-Vera, I., Manzanilla-López, R.H. and Martínez, G.A. (2001). Selection of Mexican *Verticillium chlamydosporium* (Goddard) strains to control *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944. *Nematropica* 31: 132 (abstract).
- Flores-Camacho, R., Manzanilla-López, R.H., Cid del Prado-Vera, I. and Martínez Garza, A. (2007). Control de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 con *Pochonia chlamydosporia* (= *Verticillium chlamydosporium*) (Goddard) Zare y W. Gams. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25: 26-34.
- Flores-Camacho, R., Atkins, S.D., Manzanilla-López, R.H., Cid del Prado-Vera, I. y Martínez-Garza, Á. 2008. Caracterización de aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare para el control biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 93-104.

- Franco-Navarro, F., Pérez-Rodríguez, I., Doroteo-Mendoza, A., Vilchis-Martínez, K., Hernández-Pérez, M.A., González-Cornejo, B., Miranda-Damian, J. 2006. Estado actual del conocimiento de *Pochonia chlamydosporia* en México. Memorias, XXIX Congreso Nacional de Control Biológico, Manzanillo, Colima, México, pp. 65-69.
- Franco-Navarro, F., Vilchis-Martínez, K. and Miranda-Damián, J. 2009. New records of *Pochonia chlamydosporia* from México: Isolation, root colonization and parasitism of *Nacobbus aberrans* eggs. *Nematropica* 39: 133-142.
- Frans, A.A., De Leij, F.A.A.M. and Kerry, B.R. 2001. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* (Goddard), as potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. *Revue de Nématologie* 14: 157-164
- Gamal, A.E., Dong, W.L., Jung, C.P., Hwang, B.Y. and Ho, Y.C. 2008. Evaluation of various plant extracts for their nematicidal efficacies against juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Journal de Asia-Pacífico Entomología* 11: 99-102
- Gams, W. 1988. A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 94: 123-148.
- Glass, D. J. 1995. Biotic effects of soil microbial amendments. In: Soil amendments. Impacts on Biotic Systems (Ed. Rechcigl, J.E.) Lewis Publishers, CRC Press, Inc. pp 885-886.
- Grainge, M. and Ahmed, S. 1988. Handbook of plants with pest-control properties. John Wiley and Sons, New York, USA. 470 p.
- Greco, N. and Di Vito, M. 2009. Population dynamics and damage levels. In Root-Knot Nematodes (Eds. Perry, R.N., Moens, M. and Starr J.L.). CABI, U.K., pp. 46-69.
- Guedes, C.M., Melo De Souza, C., De Morais, V., Alves De Carvalho, G.E. e De Paiva F.S. 2002. Efeitos de extratos aquosos de tiririca sobre a germinação

de alface, pimentão e jiló e sobre a divisão celular na radícula de alface. *Ceres* 49: 1-11.

Hans-Börje, J. 1985. The biology of the nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. In *Fitonematología Avanzada* (1). Marbán-Mendoza, N. and Thomason I.J. (Eds.). Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, pp. 177-194.

Halbrendt, J.M. 1996. Allelopathy in the management of plant parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 28: 8-14.

Hernández, M.A. e Hidalgo-Díaz L. 2008. KlamiC: Bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* *Revista de Protección Vegetal* 23: 131-134

Hidalgo, L. (2000). Potencialidades de cepas autóctonas de *V. chlamydosporium* (Goddard) como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp. Tesis por el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAHCENSA. pp. 93-94.

Hidalgo-Díaz, L., Bourne, M.J., Kerry, B.R. and Rodríguez, M.G. 2000. Nematophagus *Verticillium* spp. in soil infested with *Meloidogyne* in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management* 46: 277-284.

Hobbs, P.J., Misselbrook, T.H. and Pain, B.F. 1999. Characterisation of odorous compounds and emissions from slurries produced from weaner pigs fed dry feed and liquid diets. *Journal of Science Food Agriculture* 73: 437-445.

Hunt, D. J. Handoo, Z. A. 2009. Chapter 3 Taxonomy, identification and principal species. In *Root- Knot Nematodes* (Eds. Perry, R.N., Moens, M. and Starr J.L.). CABI, U.K., pp. 55-88.

Jaffee, B.A. and Zasoski, R.J. 2001. Soil pH and the activity of a pelletized nematophagous fungus. *Phytopathology* 91: 324-330

- Khan, T.A. and Saxen, S.K. 1997. Integrated management of root knot nematode *Meloidogyne javanica* infecting tomato using organic materials and *Paecilomyces lilacinus*. *Bioresource Technology* 61: 247-250.
- Karszen, G. 2002. The plant-parasitic nematode genus *Meloidogyne* Göldi, 1892 (Tylenchida) in Europe. Brill Leiden, Boston, Köln, 157 p.
- Kaşkavalacı, G. and Civelek, H. S. 2009. Effects of two plants extracts on the damage of *Meloidogyne incognita* in tomato plants. *Ekoloji* 18: 16-22.
- Kerry, B.R. 1995. Ecological considerations for the use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Canadian Journal of Botany* 73: 565-570.
- Kerry, B.R. and Bourne, J.M. 1996. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pest Science* 47: 69-75.
- Kogiso, S., Wada, K. and Munakata, K. 1976. Odoracin, a nematicidal constituent from *Daphne odora*. *Agricultural Biological Chemistry* 40: 2119-2120.
- Kokalis-Burelle, N. and Rodríguez-Kábana, R. 2006. Allelochemicals as biopesticides for management of plant parasitic nematodes. In: Inderjit and K. G. Mukerji (Eds.). *Allelochemicals: biological control of plant pathogens*. Springer. Netherlands, pp. 15-30.
- Krischik, V.A. and Denno, R.F. 1983. Individual, population, and geographic patterns in plant defense. In: Denno, R.F. and McClure, M. (Eds). *Variable plants and herbivores in natural and managed systems*. Academic Press, New York, USA., pp. 463-512.
- Layne-Garsaball, J.A. y Méndez-Natera, J.R. 2006. Efectos de extractos acuosos del follaje del corocillo (*Cyperus rotundus*) sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de caraota (*Phaseolus vulgaris*). *Boletín del*

Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela 40: 207–226.

Langenheim, J.H. 1994. Higher plants terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20: 1223-1280.

Ley de Desarrollo Rural Sustentable (LDRS). 2001. Texto vigente últimas reformas publicadas DOF 18-06-2010. Art. 3° Fracción XXII.

López, J.H. 1990. Evaluación de la resistencia de cuatro variedades de frijol común al nematodo nodulador de la raíz (*Meloidogyne*) en condiciones de invernadero. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador. 66 pp.

Lopez-Llorca, L., Olivares-Bernabeu, C., Salinas, J., Jansson, H. and Kolattukudy, H. 2002. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycology Research* 106: 499-506.

Luambano-Nyoni, N. 2009. Potential of biocontrol agents and compatible cultural practices for root-knot nematode management in tomato. Thesis Doctor of Philosophy in Plant Nematology Department of Plant Science and Crop Protection, Faculty of Agriculture University of Nairobi, pp 113-124.

Lumsden, R. D., Lewis, J. A., Fravel, D. R. 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. In: *Biorational Pest Control Agents. Formulation and delivery.* (Eds. Hall F.R. & Barry J.W.) American Chemical Society, Washington, DC. pp 1-18.

Lyons, J.M., Keith, A.D. and Thomas, I.J. 1975. Temperature-induced phase transitions in nematode lipids and their influence on respiration. *Journal of Nematology* 7: 98-104.

Mahmood, A. and Siddiqui, Z.A. 1993. Effect of phenolics on the growth of tomato and reproduction of *Rotylenchulus reniformis*. *Nematologia Mediterranea* 21: 97-98.

- Mahajan, R., Singh, P., Bajaj, K.L. and Kalsi, P.S. 1986. Nematicidal activity of some sesquiterpenoids against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Nematologica* 32: 119-23.
- Marbán-Mendoza, N., Dicklow, M. and Zuckerman, B. 1989. Evaluation of control of *Meloidogyne incognita* and *Nacobbus aberrans* on tomato by two leguminous plants. *Revue de Nématologie* 12: 409-412.
- Martínez-Fuentes, R., Tovar-Soto, A. y Torres-Coronel, R. 2010. Penetración y establecimiento de *Nacobbus aberrans* [(Thorne 1993) Thorne y Allen), 1944] Población Chapingo en cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 61-63.
- Mena, C.J. y Velázquez, R.V. 2010. Manejo integrado de plagas y enfermedades de frijol en Zacatecas. Folleto Técnico No. 24. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP, 83 pp.
- Moens, M., Perry, R.N. and Starr, J.L., 2009. *Meloidogyne* species- a Diverse Group of Novel and Important plant parasites. In: *Root-Knot Nematodes* (Eds. Perry, R.N., Moens, M. and Starr, J.L.). CABI, U.K., pp. 8-9.
- Montes-Belmont, R. 2000. *Nematología vegetal en México, Investigación documental*. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Segunda edición, 98 pp.
- Montes-Belmont, R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología* 29: 73-82.
- Montes-Belmont, R. y Flores-Moctezuma, H.E. 2011. La alelopatía como base científica para el manejo de nematodos fitoparásitos. En: Rodríguez-Hernández, C., López-Olguín, J. F. y Aragón-García, A. (Eds.). *Alternativas ecológicas contra plagas. Agricultura sostenible 7*. Colegio de Postgraduados y Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, pp. 167-182.

- Morton, C.O., Hirsch, P.R. and Kerry, B.R. 2004. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi - a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology* 6: 161-170.
- Munakata, K. 1983. Nematocidal natural products. In: Whitehead D.L. and Bowers, W.S (Eds). *Natural Products for innovative pest management*. Oxford: Pergamon. U.K., pp. 299-310.
- Natarajan, N., Cork, A., Boomathi, R., Pandi, R., Velevar, S. and Dhakshnamoorthy, G. 2006. Cold aqueous extracts of african marigold, *Tagetes erecta* for control tomato root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection*. 25: 1210-1213.
- Nelson, B.R. 1979. The evolution of parasitic fitness. In: Horsfall J.G. and Dimond, A.E. (Eds). *Plant Disease: An Advanced Treatise Vol. IV*. Academic Press, New York, pp. 23-46.
- Njoku, C.J., Zeng, L., Asuzu, I.U. Orbelies, N.H. and McLaughlin, L. 1997. Oleanolic acid, a bioactive component of the leaves of *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *International Journal of Pharmacognosy* 35: 134-137.
- Nogueira, M.A. de Oliveira, J.S. Ferraz, S. and dos Santos, M.A. 1996. Nematicidal constituents in *Mucuna aterrima* and its activity on *Meloidogyne incognita* race 3. *Nematologia Mediterranea* 24: 249-52.
- Osman, A.A. and Viglierchio, D.R. 1988. Efficacy of biologically active agents as non traditional nematicides for *Meloidogyne javanica*. *Revue de Nématologie* 11: 93-98.
- Oka, Y., Shapira, N. and Fine, P. 2007. Control of root-knot nematodes in organic farming systems by organic amendments and soil solarization. *Crop Protection* 26: 1556-1565.

- Palacios, A.C. y Sosa Moss, C. 1970. Resistencia genética de algunas variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) al ataque de *Meloidogyne* spp. Agrociencia Serie D 9: 119-125.
- Pérez, M.P., Navas-Cortés, J.A., Pascual-Villalobos, M.J. y Castillo, P. 2003. Nematicidal activity of essential oils and enmendments from Asteraceae against root-Knot nematodes. Plant Pathology 52: 395-401.
- Pérez-Rodríguez, I., Franco-Navarro, I. Cid del Prado-Vera, E. Zavaleta-Mejía. 2010. Control of *Nacobbus aberrans* in chili pepper (*Capsicum annum* L.) by the combination of organic amendmets, nematophagous fungi and nematicides. Nematropica 41:122-129.
- Perry, R.N., Moens, M. and Starr, J.L. (Eds). 2009. Root-Knot nematodes. CABI. Oxfordshire, U.K., 520 pp.
- Peteira, B., Esteves, I. e Hidalgo-Díaz, L. 2006. Detección de proteasas producidas por *Pochonia chlamydosporia* en medio sólido. Revista Protección Vegetal 21: 186-190.
- Potter, M.J., Davies, K. and Rathjen, A.J. 1998. Suppressive impact of glucosinonates in *Brassica* vegetative tissues on root lesion nematode *Pratylenchus neglectus*. Journal of Chemical Ecology 24: 67-80.
- Poinar, G.O., Acra, A. and Acra, F. 1994. Earliest fossil nematode (Mermithidae) in Cretaceous Lebanese amber. Fundamental and Applied Nematology 17: 475-477.
- Rao, M.S., Reddy, P.P., Mittal, A., Chandravadana, M.V. and Nagesh, M.1996. Effect of some secondary metabolites as seed treatment agents against *Meloidogyne incognita* on tomato. Nematologia Mediterranea 24: 49-51.
- Renukappa, T., Ross, G., Klaiber, B., Vogler, B. and Kraus, W. 1999. Application of high perfomance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectrometry and bioassay for determination of active saponins from *Bacopa moniera* Wettst. Journal of Chromatography 847 A: 109-116.

- Rich, J.R, Keen, N.T. and Thomason, I.J. 1977. Association of coumestans with the hypersensitivity of lima bean roots to *Pratylenchus scribneri*. *Physiological Plant Pathology* 10: 105-116.
- Rodríguez-Kábana, R. 1991. Control biológico de nematodos parásitos de plantas. *Nematropica* 21: 111-122.
- Saleh, M.A., Abdel Rahman, F.H., Ibrahim, N.A. and Taha, N.M. 1987. Isolation and structure determination of new nematicidal triglyceride from *Argemone mexicana*. *Journal of Chemical Ecology* 13: 1361-70.
- Sayre, R.M., Patrick, Z.A. and Thorpe H.J. 1965. Identification of a selective nematicidal component in extracts of plant residues decomposing in soil. *Nematologica* 11: 263-68.
- Salas, F., Luis, A. y Vargas, G.E. 1984. El nematodo foliar *Aphelenchoides besseyi* Christie (Nematoda: Aphelenchoidea) como causante de la falsa mancha angular del frijol en Costa Rica. Nota técnica. *Agronomía Costarricense* 8: 65-68.
- Santoro, I., Sorribas, F.J. and Ornat, C. 1998. Detección de hongos parásitos de huevos de *Meloidogyne* en cultivos hortícolas A: III Jornada de Protección Vegetal. *Viticultura Enología Profesional. Protección vegetal. Barcelona, 20 de noviembre de 1998. pp. 1-5.*
- Sangwan, R.S., Sangwan, N.S. and Luthra, R. 1993. Metabolism of acyclic monoterpenes: Partial purification and properties of geraniol dehydrogenase from lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). *Journal of Plant Physiology* 142: 129-134.
- Sasser, J.N. and Carter C.C. 1985. Overview of the International *Meloidogyne* Project 1975-1984. In: Sasser, J.N. and Carter, C.C. (Eds). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Raleigh, North Carolina State University Graphics, USA. pp. 19-24.

- Scheffer, F., Kickuth, R. and Visser, J.H. 1962. Die Wurzelausscheidungen von *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees und ihr Einfluss auf Wurzelknoten-Nematoden. Z. Pflanzenernahr. Bodenkd 98: 114-20.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2008. México. <www.siap.gob.mx>[última consultada en Febrero del 2011].
- Soler-Serratos, A., Kokallis-Burelle, N., Rodríguez-Kábana, R., Weaver, C.F. and King, L. 1996. Allelochemicals for control of plant parasitic nematodes. In vivo nematicidal efficacy of thymol and thymol/benzaldehyde combinations. Nematropica 26: 57-71.
- Stirling, G.R. 1991. Conservation and enhancement of naturally occurring antagonist and the role of organic matter. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes. CAB International, U.K., pp. 166-185.
- Stirling, G.R. and Smith, L. (1998). *Field tests of formulated products containing either Verticillium chlamydosporium or Arthrobotrys dactyloides* for biological control of root-knot nematodes. Biological Control 11: 231-239.
- Taba, S., Sawada, J. and Moromizato, Z. 2008. Nematicidal activity of Okinawa Island plants on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. Plant Soil 303: 207-216.
- Varon de Agudelo, F. y Riedel, M.R. 1982. Principales nematodos que atacan al frijol y su control. Guía de estudio para ser usada como complemento de la unidad audio-tutorial sobre el mismo tema. Programa de Frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, 37 pp. (Serie 04SB-06.10).
- Velásquez, V.R. y González, G.N. 1991. Nematodos noduladores que atacan al cultivo de frijol en Zacatecas. Desplegable para Productores No. 4. Campo Experimental Zacatecas-INIFAP, SARH.

- Verpoorte, R. 2000. Secondary metabolism. In: Metabolic engineering of plant secondary metabolism Verpoorte, R. and Alfermann, A.W. (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp. 181-186.
- Viaene, M. and Abawi, G.S. (2000). *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. *Journal of Nematology* 32: 85-100
- Viglierchio, D.R. and Wu, F.F. 1989. Selected biological inhibitors for *Heterodera schachtii* control. *Nematropica* 19: 75-79.
- Widmer, T.L. and Abawi, G.S. 2000. Mechanism of suppression of *Meloidogyne hapla* and its damage by a green manure of Sudan grass. *Plant Disease* 84: 562-68.
- Wuyts, N. 2006. Interacciones entre los nematods fitoparásitos y el metabolismo secundario de plantas, con énfasis en los fenilpropanoides en las raíces. Tesis de Doctorado (PhD) Facultad de Bioingeniería, Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica. *Infomusa* 15: 43-44.
- Zasada, I.A. and Ferris, H. 2004. Nematode suppression with brassicaceous amendments: application based upon glucosinolate profiles. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1017-1024.
- Zare, R. and Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* sect. *Postrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia* 73: 51-86.
- Zinovieva, S.V. and Chalova, L.I. 1987. Phytoalexins of potato and their role in the resistance to stem nematodes. *Helminthologia* 24: 303-309.

ANEXOS

Anexo 1. Extractos vegetales acuosos

Las plantas fueron colectadas en campo y se secaron a temperatura ambiente bajo sombra por un periodo aproximado de 30 días.

Se llevaron a un proceso de pulverizado en un molino de martillos.

Los polvos se mantuvieron en frascos ámbar a temperatura ambiente.

Se colocaron 25g de polvo en 1L de agua destilada estéril a una temperatura de 4°C por un periodo de 24hrs.

Se filtró para eliminar el excedente de material vegetal y el líquido resultante con un filtro Nalgene® (Rochester, New York) de 0.20µm de apertura y 250ml de capacidad.

El material obtenido se mantuvo a 4°C para su posterior uso.

Anexo 2. Obtención de huevos de *Meloidogyne* sp. (R.H. Manzanilla-López, sin publicar)

Usando plantas de jitomate (alrededor de 6-8 semanas de edad) infectadas con *Meloidogyne* sp. es suspendido el riego uno o dos días antes de su manejo para facilitar la colección de las masas.

Con extremo cuidado es removido el sustrato en el que se encuentra la raíz, las raíces agalladas son separadas con ayuda de agujas de disección y tijeras.

El total de raíces es lavado en el primer tamiz (no. 100 mallas de abertura) para remover la mayor cantidad de tierra o sustrato posteriormente se lleva por otro tamiz de abertura más fina (no. 200 mallas) y finalmente se colecta el contenido del tamiz de 40µm de abertura de malla y se coloca en un recipiente de vidrio.

Las raíces desnudas son depositadas en bolsas de plástico para su posterior manejo (puede colocarse una toalla de papel húmeda en la bolsa para conservar la humedad necesaria).

Usando un microscopio estereoscópico, pinzas finas y aguja de jeringa de insulina 0.5ml (BD ultra-fine®), se retiran con extremo cuidado las masas de huevos de la raíz para colocarlas en agua destilada estéril contenida en un bloque excavado de vidrio excavado (Analar®).

Del recipiente de vidrio en donde se colectó el resultante del tamiz 40 μ m, se toman pequeñas alícuotas que se colocan en la base de una caja Petri para buscar en ella masas de huevos que se hayan desprendido de la raíz antes lavada, las masas obtenidas se colocan también en el bloque de vidrio excavado.

Las masas obtenidas pueden colocarse al fondo de un micro-tubo de microcentrifuga retirando la mayor cantidad de humedad posible para ser colocadas en refrigeración.

De las masas obtenidas en el proceso anterior, se colocan en un bloque de vidrio excavado con agua destilada para separar la mayor cantidad posible de la masa gelatinosa que cubre los huevos.

Todo el contenido del bloque de vidrio excavado es colocado en un tubo estéril para centrifuga de 50ml (Sterilin®. Staffs, U.K.) y se afora a un volumen conocido.

En ese mismo tubo se agregan el mismo volumen de NaOCl al 75% y se agita en el vortex (Fisherbrand®) por un periodo máximo de 2min para disolver la mayor cantidad posible de la masa gelatinosa que cubre a los huevos.

De inmediato la suspensión de huevos se lleva a la campana de flujo laminar en donde previamente se esterilizaron tres pequeños tamices de 125, 53 y 20 μ m de abertura de malla por un periodo de 20min bajo luz ultravioleta.

Se vierte la suspensión que contiene los huevos iniciando con el tamiz de mayor apertura, hasta los más pequeños. El material (residuo) contenido en el tamiz de

10µm de abertura retiene los huevos. El residuo se colecta en un recipiente de vidrio de boca ancha para repetir el procedimiento cuatro veces a partir del último tamiz para enjuagar y eliminar todo el NaOCl de la muestra.

Por último los huevos se colectan en tubos de vidrio estériles para el momento en que serán requeridos.

2-a. Verificación de contaminantes.

Con el fin de descartar la presencia de organismos ajenos a los huevos se tomó una alícuota de 0.020 ml con un número aproximado de 150 huevos para colocarlos en placas de medio de cultivo A-A (agua-agar) y PDA (papa-dextrosa-agar), con el fin de corroborar la ausencia o presencia de organismos contaminantes después de 24, 48hrs y finalmente 5 días después.

Anexo 3. Obtención de juveniles de segundo estadio (J2).

En un recipiente cóncavo y de fondo plano, de plástico transparente o preferentemente de vidrio de 10cm de diámetro y 3cm de profundidad se coloca una coladera de común de cocina de un diámetro que permita colocarlo dentro del recipiente.

Sobre la coladera se coloca un pañuelo desechable de papel (Kleenex).

Se llena el recipiente con agua destilada estéril hasta que toque el fondo de la coladera y el pañuelo se humedezca.

Sobre el pañuelo se colocan los huevos del nematodo obtenidos en el proceso descrito en el anexo anterior.

Finalmente se colectan 24 y 48hrs después J2 del fondo del recipiente.

Los J2 se pueden colectar en tubos de vidrio con tapa y mantenerlo en refrigeración hasta su utilización, considerando que el tiempo puede afectar la viabilidad de los J2.

Anexo 4. Obtención de clamidosporas.

Partiendo de una caja Petri conteniendo al hongo *P. chlamydosporia* con crecimiento de 21 días, se le aplican 5ml de agua-agar al 5% previamente esterilizada.

Realizar un lavado utilizando un triangulo de vidrio; lo obtenido de este lavado es llevado a un pequeño tamiz de abertura de mallas del número 500.

Lo obtenido en el tamiz se colecta en un frasco de vidrio esterilizado utilizando agua destilada estéril. Para conocer la concentración de clamidosporas se utilizó un hematocitómetro.

Anexo 5. Obtención de conidias de *P. c. var. chlamydosporia*

A partir de placas conteniendo medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA, Oxoid Basingstoke Hampshire, England) con crecimiento del hongo *Pochonia chlamydosporia* de los aislamientos Pc341 y del Pc10.

Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar para guardar la mejor asepsia posible. A partir de una placa de PDA con crecimiento del hongo *P.chlamydosporia*, se realiza un lavado con 5ml de agua destilada estéril utilizando un triángulo de vidrio para desprender gentilmente el micelio que contiene las conidias.

El producto del lavado se pasa por un tamiz de 20µm de apertura. La alícuota resultante puede ser depositada en una base de caja Petri ya que en ella se encuentran las conidias, el micelio puede volverse a lavar con aproximadamente 10ml más de agua destilada estéril con el fin de obtener el mayor número de conidias en la muestra.

La alícuota con las conidias se colocará en un tubo estéril de 50ml para su almacenamiento en refrigeración hasta su utilización. Se toman 0.020ml para realizar un conteo en el hematocitómetro para conocer la concentración de conidias obtenida.

Para este experimento la concentración deseada es de 5.5×10^4 conidias ml^{-1} . Para obtener esta concentración, la solución podrá ser aforada utilizando medio nutritivo a base de extracto de levadura (EL [50g/L]) (Mikrobiologie®, Darmstadt, Germany). Después de haber sido aforado las conidias deben utilizarse antes de 24hrs, pues al ser un medio muy rico las conidias pueden empezar a germinar.

Anexo 6. Arroz inoculado con *Pochonia chlamydosporia* (modificado de Hidalgo, 2000).

Fase Líquida

Se añade 40g de arroz previamente enjuagado por cada litro de agua destilada.

La mezcla es calentada hasta alcanzar punto de ebullición y se deja así por 30min.

La mezcla es filtrada con gasa triple para ser esterilizada en autoclave 20min a 120 libras de presión.

Se deja enfriar a temperatura ambiente y se le añaden cinco discos de medio de cultivo con crecimiento de *Pochonia chlamydosporia* además de sulfato de estreptomicina (50mg L^{-1}), cloranfenicol (50mg L^{-1}) y clorotetraciclina (50mg L^{-1}).

La mezcla ya inoculada es incubada durante tres días a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en agitación constante (150rpm).

Fase sólida

El arroz o maíz es lavado con agua potable hasta eliminar la apariencia lechosa del agua (3 ó 4 lavados), se escurre y deja secar en la intemperie.

El sustrato (arroz o maíz) es pesado, empacado (200g por cada bolsa de polipapel de 25X35cm) y engrapado para ser esterilizado en autoclave por 20min a 120 libras de presión.

Las bolsas se dejan reposar por un periodo de 24 horas.

Cada bolsa es inoculada con 20ml de lo obtenido de la mezcla obtenida de la fase líquida, para lo que se utiliza una jeringa de repostería. Posteriormente se sella con cinta adhesiva en la zona donde se introdujo la aguja.

Las bolsas inoculadas se incuban durante 21 días a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, moviéndolas cada tercer día.

Transcurrido el periodo de incubación, las bolsas se abren y el sustrato se vierte en charolas para secarlo a 40°C durante aproximadamente 48hrs.

Lo obtenido es envasado para su almacenaje o utilización.

Anexo 7. Diagrama para evaluar el índice de agallamiento por nematodo agallador (tomado de Bridge y Page (1980) en Coyne *et al.*, 2007).



0 – No se observan nódulos en las raíces.



1 – Pocas agallas pequeñas, difíciles de encontrar.



2 – Solo agallas pequeñas pero claramente visibles. Las raíces principales limpias.



3 – Algunas agallas visibles y grandes.



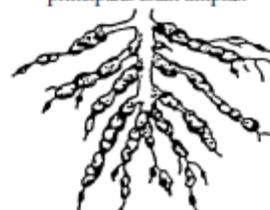
4 – Predomina las agallas grandes pero las raíces principales están limpias.



5 – 50% de las raíces afectadas. Agallado de algunas de las raíces principales. Sistema radical reducido.



6 – Agallado en las raíces principales.



7 – La mayoría de las raíces principales agalladas.



8 – Todas las raíces principales agalladas incluyendo la central. Se observan pocas raíces limpias.



9 – Todas las raíces gravemente agalladas. Las plantas generalmente se están muriendo.



10 – Todas las raíces severamente agalladas. No hay sistema radical. Las plantas generalmente muertas.