



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

BIODESINFECCIÓN DEL SUELO Y USO DE *Pochonia chlamydosporia* EN EL MANEJO DE *Meloidogyne arenaria* EN EL CULTIVO DE GUAYABO EN EL ORIENTE DE MICHOACÁN.

TORRES LÓPEZ JAPHET

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis titulada: **BIODESINFECCIÓN DEL SUELO Y USO DE *Pochonia chlamydosporia* EN EL MANEJO DE *Meloidogyne arenaria* EN EL CULTIVO DE GUAYABO EN EL ORIENTE DE MICHOACÁN**, realizada por el alumno: **JAPHET TORRES LÓPEZ** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

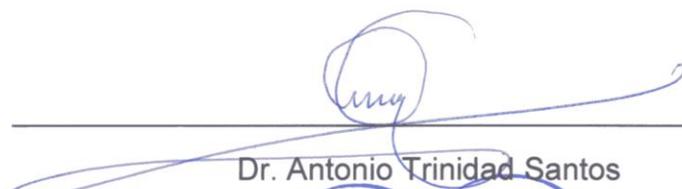
CONSEJERO _____


Dr. Ignacio Cid del Prado Vera

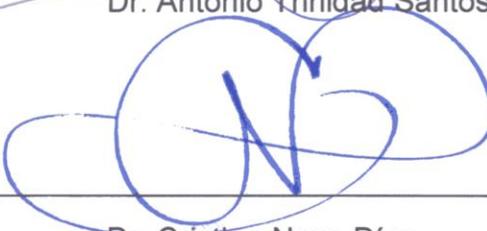
ASESOR _____


Dra. Raquel Alatorre Rosas

ASESOR _____


Dr. Antonio Trinidad Santos

ASESOR _____


Dr. Cristian Nava Díaz

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril de 2014.

RESUMEN

Japhet Torres López, MC.

Colegio de Postgraduados, 2014

El objetivo de esta investigación fue estudiar la respuesta de los árboles de guayabo al tratamiento con diferentes abonos orgánicos y la incorporación del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* y el efecto en la reducción de juveniles (J2) de *Meloidogyne arenaria*. Se tomaron muestras de suelo infestados con el nematodo en la región guayabera oriente del estado de Michoacán, México. Se obtuvieron dos aislamientos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* provenientes de raíz y suelo. Se obtuvieron *in vitro* los aislamientos, de raíz que parasitó 89 % huevos de *Meloidogyne* sp. y el aislamiento de suelo parasitó 83% con una producción de $18 \times 10^7 \cdot g^{-1}$ y $11 \times 10^7 \cdot clamidosporas/g^{-1}$ respectivamente. Se aplicaron 13.5 kg, 42 kg y 13.5 kg de gallinaza, vermicomposta y alfalfa molida respectivamente a cada árbol con el tratamiento correspondiente. El uso de los abonos orgánicos redujo la población de *M. arenaria* juvenil (J2), el mejor tratamiento en el sitio cerro colorado correspondió a vermicomposta + *P. chlamydosporia* reduciendo la población inicial de 571 (J2) a 21, mientras en el testigo la población inicial de 200 juveniles se mantuvo tanto en el primero como en el último muestreo. En el sitio a florida el mejor tratamiento fue el de Vermicomposta + *P. chlamydosporia* ya que se redujo la población de juveniles de 750 a 90 (J2) en 300 gr. de suelo en comparación con el testigo donde la población inicial de 134 incremento a 250 juveniles (J2) en el último muestreo. En el parámetro de cosecha en el sitio cerro colorado el tratamiento Gallinaza + *P. chlamydosporia* fue el mejor con 244 Kg. en comparación con el testigo que fue de 112 Kg. y el sitio la florida en cosecha el mejor tratamiento fue Alfalfa molida con 229 Kg. Este es el primer reporte de la presencia de *P. chlamydosporia* en el estado de Michoacán y su uso como potencial agente de control biológico del nematodo agallador *Meloidogyne arenaria* en el cultivo de guayabo.

Palabras clave: Nematodo, *Meloidogyne arenaria*, vermicomposta, *P. chlamydosporia*, hongo nematófago.

ABSTRACT

Japhet Torres López, MC.

Colegio de Postgraduados, 2014

The objective of this research was to evaluate the response of guava trees to treatment with different organic fertilizers and the incorporation of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* and its effect in reducing the root-knot nematode. Soil samples infested with the nematode *Meloidogyne arenaria* in the eastern region of the state of Michoacán, Mexico, were collected. Two native strains of the nematophagous fungi, *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* were isolated from roots and soil. In vitro isolates from roots parasitized 89 % eggs of *Meloidogyne* sp. and the isolate from the soil 83 %, with a production of $18 \times 10^7 \cdot \text{g}^{-1}$ and $11 \times 10^7 \cdot \text{clamidosporas/g-1}$ respectively. In the experimental area 13.5 kg, 42 kg and 13.5 kg of poultry manure, vermicompost and ground alfalfa were applied respectively to each tree with the corresponding treatment. The use of organic fertilizers reduced the population of *M. arenaria* juveniles (J2), the best treatment in the cerro colorado site was attributed to vermicompost + *P. chlamydosporia* which reduced the initial population of 571 (J2) to 21, while in the control the initial population of 200 juveniles was similar to the last sampling. In florida site the best treatment was to Vermicomposta + *P. chlamydosporia* it reduced the initial population of 750 juveniles to 90 (J2) in 300 gr. of soil compared to the control where the initial population was 134 and the final population count was 250 juveniles (J2) at the last sampling. Considering harvesting, at the cerro colorado site treated with Gallinaza + *P. chlamydosporia* was the recorded the best harvest, 244 kg of guava was harvested compared to the control where only 112 kg harvested, at the site Florida the the best production corresponded to the treatment with ground alfalfa with a total production of 229 Kg. This the first report of *P. chlamydosporia* in the state of Michoacán and its potential use as a biological control agent of root-knot nematode guava.

Key Words: Nematode, *Meloidogyne arenaria*, Vermicompost, *P.chlamydosporia*, nematophagous fungus.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico que me brindó y así me fuera posible realizar mis estudios de Maestría.

Al **Colegio de Postgraduados** especialmente al programa de Fitopatología por otorgarme la oportunidad de poder continuar con mis estudios y superarme profesionalmente.

Al **Ing. Leopoldo Mena Torres del rancho la florida** y **El Sr. Arturo Santana del rancho cerro colorado** por su gran apoyo en las actividades de campo y las facilidades prestadas para la realización del experimento.

Al **Dr. Ignacio Cid Del Prado Vera, Dr. Antonio Trinidad Santos, Dra. Raquel Alatorre Rosas y Dr. Cristian Nava Díaz** quienes oportunamente realizaron aportaciones, observaciones y comentarios indispensables para la correcta elaboración de la presente investigación.

A la **M.C. Alfonsina Judith Hernández** por abrirme las puertas del laboratorio de diagnóstico de fitosanidad y además brindarme su ayuda incondicional.

Al **M.C. Francisco Franco Navarro** por compartirme sus múltiples conocimientos en el momento que más los necesitaba.

Al señor **Arturo** por su importante apoyo en el laboratorio de nematología.

DEDICATORIA

A mis padres Vicdai Torres Ríos y Mayra López Vázquez porque toda la vida me han obsequiado cariño, respeto y sobre todo confianza, y en ésta ocasión no fue la excepción. Su inagotable apoyo para poder cumplir mis sueños me ha hecho una persona con pasos firmes y con mucha confianza, éste es uno de los logros que quiero dedicárselo a ustedes papás.

A mi hermano Vicdaí Torres López, él ha sido y lo será por siempre un modelo a seguir como persona y a la cual amo tanto. Ha estado presente física y mentalmente en el camino de la vida que he recorrido e indiscutiblemente me ha auxiliado en múltiples ocasiones, hoy tuve la dicha de contar con su apoyo una vez más ayudándome directamente en algunas de las actividades realizadas en la presente investigación.

A toda mi familia por creer en mí, y darme todos esos buenos consejos que me condujeron por el buen camino. Porque la convivencia con ellos me ha hecho una persona íntegra y que además les tiene mucho cariño a todos por igual.

A Elizabeth García León y a Marcelo Martínez Muños porque sin ellos me hubiera sido imposible el desarrollo de ésta investigación, su asistencia en diferentes actividades claves me permitieron la culminación de éste trabajo.

Contenido

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. El cultivo del guayabo	4
2.1.1. Clasificación Taxonómica	4
2.1.2. Propiedades químicas de la guayaba	4
2.1.3. Importancia mundial del cultivo de guayabo	5
2.1.4. Importancia del cultivo en México	5
2.1.5. La región guayabera del Oriente de Michoacán	6
2.2. Descripción botánica	7
2.2.1. Árbol	7
2.2.2. Hojas	7
2.2.3. Flores	8
2.2.4. Fruto	8
2.2.5. Raíz	8
2.3. Problemas fitosanitarios del guayabo	8
2.3.1. Plagas	8
2.3.2. Enfermedades	9
2.4. Nematodos agalladores <i>Meloidogyne</i> spp.	9
2.4.1. Características morfológicas del género <i>Meloidogyne</i>	10
2.4.2. Ciclo biológico	11
.....	12
2.4.3. Distribución de <i>Meloidogyne</i> spp. en México	12
2.5. Biofumigación o biodesinfección de suelos	13
2.5.1. Biodesinfección de suelos	14
2.6. Generación de compuestos nematocidas durante la degradación de materiales orgánicos	15
2.6.1. Compuestos derivados de los glucosinolatos	15
2.6.2. Ácidos orgánicos	16
2.6.3. Compuestos nitrogenados	17
2.6.4. Compuestos derivados de Glucósidos	18
2.6.5. Otros compuestos	18
2.7. Hongos nematófagos	19
2.7.1. Hongos Parásitos de Nematodos	19

2.7.2. <i>Pochonia chlamydosporia</i> (Goddard) Zare & W. Gams = <i>Verticillium chlamydosporium</i> Goddard.....	20
2.7.3. Taxonomía y rango de hospederos	21
2.7.4. Aislamiento y reproducción.....	21
2.8. JUSTIFICACIÓN.....	22
III. OBJETIVOS.....	23
IV. HIPÓTESIS.....	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1. Áreas de estudio y su localización	25
5.2. Identificación de las especies de <i>Meloidogyne</i>	25
5.3. Muestreo y colecta de material para realizar el aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i>	25
5.4. Aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> a partir de raíces de guayabo.	26
5.5. Aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> a partir de suelo de la rizósfera de guayabo.....	26
5.6. Identificación cultural y Morfológica de <i>P. chlamydosporia</i>	27
5.7. Identificación Molecular de <i>P. chlamydosporia</i>	28
5.7.1. Extracción de ADN	28
5.7.2. Amplificación y secuenciación	28
5.8. Reproducción masiva del Hongo	28
5.8.1. Fermentación líquida.....	28
5.8.2. Concentración de inóculo	29
5.8.3. Fermentación Sólida.....	30
5.9. Pruebas de <i>P. chlamydosporia</i> como agente de control biológico.....	31
5.9.1. Prueba de parasitismo sobre huevos de <i>Meloidogyne arenaria</i>	31
5.10. Enmiendas orgánicas.....	32
5.10.1. Cálculo de cantidad de abono orgánico por árbol	33
5.10.2. Aplicación de los abonos orgánicos.....	34
5.11. Aplicación de <i>P. chlamydosporia</i>	35
5.11.1. Cálculo de la dosis.....	35
5.11.2. Muestreo de suelos para la extracción de nematodos.....	35
5.11.2. Extracción de nematodos	36
5.11.3. Conteo e identificación de nematodos	36
5.12. Evaluación de rendimiento, diámetro y grados brix de la fruta	37
5.13. Medición del área foliar.....	38
5.14. Distribución de los tratamientos y análisis estadístico	39
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
6.1. Identificación de la especie de <i>Meloidogyne</i>	40
6.2. Aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i>	41
6.3. Caracterización morfológica de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>Chlamydosporia</i>	42
6.4. Identificación molecular de <i>Pochonia chlamydosporia</i>	44

6.5. Reproducción masiva de <i>P.chlamydosporia</i>	45
6.5.1 Parasitismo de huevos.....	46
6.6. SITIO 1. CERRO COLORADO	49
6.6.1 Evaluación inicial de la fauna nematológica	49
6.6.2. Evaluación de población de <i>Meloidogyne arenaria</i> juvenil (J2) por tratamiento en cada muestreo	50
6.6.3. Efecto de los tratamientos en la producción de fruta.....	51
6.6.4. Efecto de los tratamientos en el área foliar	52
6.6.5. Efecto de los tratamientos en la concentración de los grados brix.....	53
6.5.6. Efecto de los tratamientos en el tamaño de la fruta.....	54
6.7. SITIO 2. LA FLORIDA	55
Evaluación inicial de la fauna nematológica	55
6.6.2. Evaluación de población de <i>Meloidogyne arenaria</i> juvenil (J2) por tratamiento en cada muestreo	56
6.6.3. Efecto de los tratamientos en la producción de fruta.....	57
6.6.4. Efecto de los tratamientos en el área foliar	58
6.6.4. Efecto de los tratamientos en la concentración de grados brix	59
6.6.5. Efecto de los tratamientos en el tamaño de la fruta.....	60
6.7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	62
VII. CONCLUSIONES	65
VIII. BIBLIOGRAFÍA	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Composición química de los materiales orgánicos.	31
Cuadro 2	Distribución de tratamientos, Sitio 1. “Cerro colorado”.	37
Cuadro 3	Distribución de tratamientos. Sitio 2. “La florida”.	38
Cuadro 4	Datos arrojados por el BLAST del GenBank, para la secuencia de <i>Pochonia chlamydosporia</i>	42
Cuadro 5	Efecto de los abonos verdes y <i>P.chlamydosporia</i> sobre el guayabo y el nematodo agallador en el sitio 1. Cerro colorado.	44
Cuadro 6	Efecto de los abonos verdes y <i>P.chlamydosporia</i> sobre el guayabo y el nematodo agallador en el último muestreo del sitio 2. La florida.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Región Oriente de Michoacán: 1= Zitácuaro, 2= Tuxpan 3= Jungapeo, 4= Juárez, 5 = Tuzantla 6= Susupuato.	6
Figura 2	Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp.	12
Figura 3	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> .	26
Figura 4	Aplicación de tratamientos.	33
Figura 5	Evaluación de rendimiento, grados brix y diámetro de fruto.	36
Figura 6	Características morfológicas de <i>Meloidogyne arenaria</i> .	39
Figura 7	Morfología de <i>P. chlamydosporia</i> .	41
Figura 8	A) Maíz molido Inoculado B) Maíz colonizado por <i>P. chlamydosporia</i> de 21 días de crecimiento	43
Figura 9	Prueba de parasitismo de huevos. A) Huevos de <i>M. arenaria</i> . B, C, D) Huevos de <i>M. arenaria</i> parasitados por <i>Pochonia chlamydosporia</i> .	
Figura 10	Población inicial de nematodos en el sitio1 cerro colorado	46
Figura 11	Efecto de los tratamientos en la población de juveniles (J2) de <i>M. arenaria</i> G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más <i>P.chlamydosporia</i> , V+P= Vermicomposta más <i>P. chlamydosporia</i> , A+P= Alfalfa molida más <i>P.chlamydosporia</i> , P= <i>P. chlamydosporia</i> , T= Testigo.	47
Figura 12	Efecto de los tratamientos en el rendimiento de producción. G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más <i>P.chlamydosporia</i> , V+P= Vermicomposta más <i>P. chlamydosporia</i> , A+P= Alfalfa molida más <i>P.chlamydosporia</i> , P= <i>P. chlamydosporia</i> , T= Testigo.	48
Figura 13	Efecto de los tratamientos en el área foliar de los árboles. G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más <i>P.chlamydosporia</i> , V+P= Vermicomposta más <i>P. chlamydosporia</i> , A+P= Alfalfa molida más <i>P.chlamydosporia</i> , P= <i>P. chlamydosporia</i> , T= Testigo.	49
Figura 14	Efecto de los tratamientos en la concentración de los grados brix. G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida,	50

G+P= Gallinaza más *P.chlamydosporia*, V+P= Vermicomposta más *P. chlamydosporia*, A+P= Alfalfa molida más *P.chlamydosporia*, P= *P. chlamydosporia*, T= Testigo.

Figura 15	Efecto de los tratamientos en el tamaño de la fruta. G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más <i>P.chlamydosporia</i> , V+P= Vermicomposta más <i>P. chlamydosporia</i> , A+P= Alfalfa molida más <i>P.chlamydosporia</i> , P= <i>P. chlamydosporia</i> , T= Testigo	51
Figura 16	Población inicial de nematodos en el sitio 2 la florida	52
Figura 17	Efecto de los tratamientos en la población de juveniles (J2) de <i>M. arenaria</i> G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más <i>P.chlamydosporia</i> , V+P= Vermicomposta más <i>P. chlamydosporia</i> , A+P= Alfalfa molida más <i>P.chlamydosporia</i> , P= <i>P. chlamydosporia</i> , T= Testigo.	53
Figura 18	Efecto de los tratamientos en la de producción de fruta. G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más <i>P.chlamydosporia</i> , V+P= Vermicomposta más <i>P. chlamydosporia</i> , A+P= Alfalfa molida más <i>P.chlamydosporia</i> , P= <i>P. chlamydosporia</i> , T= Testigo.	54
Figura 19	Efecto de los tratamientos en el área foliar de los árboles. G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más <i>P.chlamydosporia</i> , V+P= Vermicomposta más <i>P. chlamydosporia</i> , A+P= Alfalfa molida más <i>P.chlamydosporia</i> , P= <i>P. chlamydosporia</i> , T= Testigo.	55
Figura 20	Efecto de los tratamientos en la concentración de los grados brix. G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más <i>P.chlamydosporia</i> , V+P= Vermicomposta más <i>P. chlamydosporia</i> , A+P= Alfalfa molida más <i>P.chlamydosporia</i> , P= <i>P. chlamydosporia</i> , T= Testigo.	56
Figura 21	Efecto de los tratamientos en el tamaño de la fruta. G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más <i>P.chlamydosporia</i> , V+P= Vermicomposta más <i>P. chlamydosporia</i> , A+P= Alfalfa molida más <i>P.chlamydosporia</i> , P= <i>P. chlamydosporia</i> , T= Testigo.	57

I. INTRODUCCIÓN

La producción de guayaba (*Psidium guajava* L.) se encuentra ampliamente extendida en países de América Latina (Brasil, México y Colombia); de África (Egipto) y de Asia (India, Pakistán, Malasia y Tailandia). Yam *et al.* 2010, reportan que India y Pakistán aportan el 50% de la producción mundial, México el 25% y el resto países como Colombia, Egipto y Brasil.

En México, el estado de Michoacán junto con Aguascalientes, Zacatecas, Jalisco y el Estado de México son los principales productores de Guayaba, alentados por la proximidad de los mercados como la ciudad de México, Guadalajara, Monterrey y los Estados Unidos de Norteamérica. Michoacán es el principal estado productor aportando 133,620 t, seguido por Aguascalientes con 95,770, Zacatecas con 46,902, Jalisco con 12,943 y México con 9,364 t año⁻¹ (SIAP, 2012).

La producción de guayaba se ve afectada por diferentes plagas, como el picudo de la guayaba (*Conotrachelus* spp.), la mosca de la fruta (*Anastrepha striata*) y el temolillo (*Cyclocephala lunulata*) (González, 1993). Entre las enfermedades destacan el clavo de la guayaba (*Pestalotia* sp.), la peca de la guayaba, de etiología desconocida y los nematodos agalladores (Avelar, *et al.*, 2001). Los principales nematodos que se han asociados al cultivo de la guayaba son: *Meloidogyne* sp. *Pratylenchus* sp. *Helicotylenchus* sp. *Hoplolaimus* sp. y *Rotylenchus* sp. (González y Col., 2009).

El género *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Nematoda: Heteroderidae) está formado por los denominados “nematodos formadores de nódulos o agallas”. Son organismos endoparásitos sedentarios de las plantas con gran importancia económica debido a que causan las mayores pérdidas en la producción de diversos cultivos (Siddiqi, 2000). Estos nematodos están ampliamente distribuidos a nivel mundial y limitan la productividad agrícola (Sasser *et al.*, 1980; Taylor y Sasser, 1978; Taylor *et al.*, 1982). Tienen la capacidad de infectar las raíces de numerosas plantas, con un rango de hospedantes que comprende más de 3,000 especies vegetales (Abad *et al.*, 2003), por lo que se consideran como polífagos. El daño que ocasionan en los cultivos se debe principalmente a la alteración de

los tejidos vasculares de la raíz lo cual reduce sustancialmente la absorción de nutrientes y agua, esto tiene como consecuencia el debilitamiento de la planta y la disminución del rendimiento (Orton 1972, 1973, 1974, 1975, Siddiqi 2000, Abad *et al.*, 2003). Los efectos negativos de *Meloidogyne* spp. se agravan en la mayoría de los casos debido a la interacción del nematodo con otros patógenos, como es el caso del complejo denominado “declinamiento del guayabo” que se atribuye a la interacción de *Meloidogyne* spp. con algunos hongos como *Fusarium solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Vercillium dahliae* y *Trichothecium roseum*. (Avelar-Mejía, *et al.*, 2001). Los árboles presentan hojas pequeñas de colores verdes o cloróticos, con crecimiento arrosado, reducción en el crecimiento de brotes, muerte regresiva de ramas, frutos pequeños y en menor cantidad, la corteza se torna de color gris, la zona del cambium adquiere una coloración rojiza y las raíces presentan agallas y pudrición. Esto es un factor limitante de la producción, además del uso ineficiente del agua, poco uso de abonos orgánicos, podas inadecuadas, presencia de plagas y enfermedades, cuya interacción redundante en el bajo rendimiento y la mala calidad de la fruta (González, *et al.*, 2002).

En guayabo, el desconocimiento sobre éstos nematodos, ha ocasionado el uso irracional de nematicidas de alta toxicidad causando grandes impactos negativos al ambiente, además han inducido resistencia del nematodo a estas sustancias, lo que provoca que éste tipo de manejo ya no sea eficiente ni redituable. Bajo estas circunstancias, un manejo alternativo de los nematodos agalladores se hace necesario, por lo que se propone la técnica de la biodesinfección y el uso del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* como biocontrolador.

La biodesinfección de suelos se fundamenta en el uso de las sustancias volátiles u otros procesos químicos o biológicos generados durante la descomposición de la materia orgánica, para el manejo de los organismos patógenos de los vegetales de origen edáfico (Bello *et al.*, 2010). *P. chlamydosporia* ha sido reportado ampliamente como parásito de nematodos formadores de agallas, y tiene potencial como agente de control biológico (Leij *et al.*, 1993; Kerry, 2001). El hongo es un parásito facultativo de nematodos que

coloniza la rizósfera de un amplio rango de cultivos e infecta masas de huevos de nematodos en la superficie de las raíces. De esta manera se busca reducir la problemática que desencadenan los nematodos del genero *Meloidogyne* spp. Contribuir con la conservación del medio ambiente y mejorar la calidad y cantidad de la producción de guayaba en las áreas agrícolas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El cultivo del guayabo

2.1.1. Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Subfamilia: Myrtoideae

Tribu: Myrteae

Género: *Psidium*

Especie: *Psidium guajava*

2.1.2. Propiedades químicas de la guayaba

El fruto de la guayaba contiene proteínas, grasas, carbohidratos, fibras, cenizas, calcio, fósforo, hierro, magnesio, zinc, cobre, sodio, potasio, vitamina A, β -caroteno, riboflavina, tiamina, niacina, vitamina B6 y ácido ascórbico (Marquina *et al.*, 2008).

La investigación de las propiedades nutra sépticas de la guayaba se ha enfocado en el contenido de la vitamina C y los carotenoides debido a su alto contenido; resultados sugieren que la guayaba tiene propiedades

antiespasmódicas y antimicrobianas útiles en el tratamiento de la diarrea y disentería en regiones tropicales así como propiedades hipoglucemiantes en modelos biológicos (Sanjinez *et al.*, 2005).

De acuerdo a Olivera, (2012) un subproducto obtenido en la elaboración de jugos de guayaba presento mayor capacidad antioxidante que las muestras provenientes de mango, por lo tanto, esto pudiera estar relacionado con su perfil de fenoles, siendo abundante en ácido benzoico, resveratrol, epicatequina y vainillina.

2.1.3. Importancia mundial del cultivo de guayabo

La guayaba (*Psidium guajava* L.) está clasificada como uno de los frutos más conocidos y estimados en la mayor parte del mundo. La producción mundial del cultivo es de alrededor de 1.2 millones de toneladas; India y Pakistán aportan el 50%, México produce el 25% y el resto aportan otros países como Colombia, Egipto y Brasil (Yam *et al.*, 2010).

El guayabo es un árbol o arbusto de sombra en jardines y traspatio, los frutos se consumen tanto en fresco como procesado, por ejemplo, en bebidas, nieves, conservas, galletas, mermeladas, ates y otros derivados (Gonzáles *et al.*, 2002).

Existen cultivares silvestres de guayaba sujetos a explotación en Colombia, que posee aproximadamente 10 millones de árboles silvestres en 33 mil ha, de las cuales sólo 500 ha son explotadas en forma intensiva (Quijano *et al.*, 1999).

2.1.4. Importancia del cultivo en México

La producción Nacional de guayaba está estimada en 295, 397 ton anuales, con una superficie sembrada de 21, 235 ha y un valor de producción de \$ 1,305, 284.88 mil pesos. El estado de Michoacán aporta el 45% de la producción nacional, Aguascalientes el 32%, Zacatecas el 15 %, Jalisco el 4% y el Estado México el 3%. (SIAP, 2012).

2.1.5. La región guayabera del Oriente de Michoacán

La región productora de guayaba en Michoacán se sitúa al Oriente del Estado, incluye a los municipios de Zitácuaro, Jungapeo, Benito Juárez, Susupuato, Tuxpan y Tuzantla, que se localizan en el Distrito de Desarrollo Rural No. 094 Zitácuaro (Figura 1.) Está enclavada en una zona de transición que comprende parte de la faja volcánica trans-mexicana y la depresión del río balsas, se cultiva desde los 600 hasta los 2,200 msnm. (Mendoza *et al.*, 2005).

Las condiciones climáticas que proporcionan el desarrollo del cultivo en la región de acuerdo a Köppen modificado por García (2002), es el clima (A) C (w1) (w) que corresponde al semicálido subhúmedo con lluvias en verano, intermedio en cuanto a condiciones de humedad. También se desarrolla en otros climas dentro de la misma región productora, pero en menor grado de importancia como en el Aw0 (w) que es cálido subhúmedo con lluvias en verano, así como los climas C (w1) (w) y C (w2) (w) que son templados con abundantes lluvias en verano.

En el año 2006 el cultivo de guayabo alcanzó una superficie aproximada de 8,847 ha. Los municipios de Benito Juárez, Susupuato y Jungapeo concentran el 75% de la superficie, siendo aproximadamente 2,965 productores distribuidos en estos tres municipios (Sánchez, 2007).

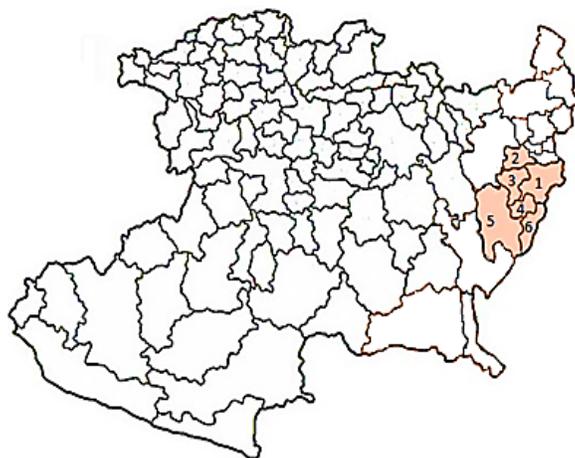


Figura 1. Región Oriente de Michoacán: 1= Zitácuaro, 2= Tuxpan 3= Jungapeo, 4= Juárez, 5 = Tuzantla 6= Susupuato.

2.2. Descripción botánica

2.2.1. Árbol

El guayabo es un árbol bajo o un arbusto arborescente de 3 a 10 m de altura que puede alcanzar hasta 10 m (Ochse, 1976). Tiene un tallo corto y torcido. Ramifica libremente cerca del suelo y puede llegar a ser muy denso (Ruehle, 1968). Frecuentemente produce chupones de raíces cerca de la base del tronco (El-Baradi, 1975).

En la corteza de sus troncos y sus ramas existen felógenos de diversos colores: verde cremoso, café verdoso, café ligero y café rojizo oscuro. Los felógenos forman capas de corcho que se desprenden en escamas o pedacitos (El-Baradi, 1975).

Las ramas más gruesas al inicio portan alas angostas en los cuatro lados; más tarde se convierten en tetrágonas de color blanco y luego de color café negruzco; las ramas viejas, son de color café rojizo claro, opacas y lisas, con lenticelas diseminadas (Ochse, 1976).

2.2.2. Hojas

Son de color verde claro u oscuro; ovales o elípticas; entrecruzadas o dísticas hacia el ápice de las ramas. Miden de 3 a 6.5 cm de ancho y de 5 a 15 cm de largo.

Existen de 10 a 25 pares de nervaduras laterales y prominentes de color amarillo verdoso, que se unen por arriba y se arquean por abajo, cerca del margen. Tienen pubescencia fina en el envés, especialmente cuando son jóvenes. Su peciolo es corto (0.3 a 1.5 cm de longitud); la base, obtusa o redondeada; el ápice, obtusamente acuminado o recortado y puntiagudo; y su borde, liso (Malo y Campbell, 1968; Ochse *et al.*, 1976).

2.2.3. Flores

Son hermafroditas y pediceladas, con un diámetro aproximado de 3.8 cm. Nacen solitarias o en grupos de dos a tres, en las axilas de las hojas que se encuentran en los crecimientos del año o de la estación en curso; rara vez son terminales (Tejada, 1980).

2.2.4. Fruto

Es una baya esférica, globulosa, elipsoidal o piriforme; sus dimensiones varían enormemente de una variedad a otra (Villaseñor, 1977). El fruto es averrugado o liso, densamente punteado, brillante, con 5 a 12 cm de largo y 5 a 7 cm de ancho (Ochse, 1976), su peso va de 30 a 225 g, en el exterior presenta un color amarillo verdoso y amarillo claro en su plena madurez; en algunos materiales se distingue un tinte ligeramente rosado en el lado expuesto (Ruehle, 1968).

2.2.5. Raíz

El guayabo destaca por la potencia de su anclaje, por lo que se le ha comparado con *Litchi chinensis* Sonn. Tiene una gran cantidad de raíces de hasta 1 mm de diámetro o más, y dispone de un gran poder de succión. En el cultivar *Pink Indian* se observó que a una distancia horizontal de 1.5 m de radio de la copa a partir del tronco, todavía se encuentra un 3% de raíces, mientras que en el plano vertical, normalmente éstas no profundizan más allá de los primeros 40 cm (Mata y Rodríguez, 1990).

2.3. Problemas fitosanitarios del guayabo

2.3.1. Plagas

Las plagas más frecuentes que afectan el guayabo en la región oriente del estado de Michoacán son: la mosquita blanca (*Argyresthia eugeniella*), la escama (*Pulvinaria psidii*), el pulgón (*Aphis* spp.), el trips (*Frankiniella* spp.), el picudo (*Conotrachelus* spp.), el salivazo (agente causal no precisado), la mosca de la fruta (*Anastrepha* spp.), araña roja (*Brevipalpus australis*), el descortezador

(*Indarbela queadrinotota*), el barrenador (agente causal no precisado), el piojo harinoso (*Pseudococcus* spp.), el chapulín (*Melanoplus* spp.), y las chicharritas (*Empoasca fabae*) (Mendoza *et al.*, 2005).

2.3.2. Enfermedades

Las enfermedades más frecuentes que afectan al guayabo en la región oriente del estado de Michoacán son los nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.), el clavo (*Pestalotiopsis* sp.) la peca (etiología desconocida), la fumagina (*Capnodium* spp. *Melolia* spp.), la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y la pudrición basal (*Dothiorella* sp.) (Volke *et al.*, 2012).

La enfermedad que actualmente presenta un gran impacto es el “declinamiento del guayabo” síndrome que se manifiesta con la aparición de hojas pequeñas de color verde cloróticas con crecimiento arrosetado, reducción en el crecimiento de brotes, muerte regresiva de ramas, frutos pequeños y en menor cantidad, la corteza se torna de color gris, la zona del cambium adquiere una coloración rojiza y las raíces presentan agallas y pudrición, lo que posteriormente ocasiona el colapso y la muerte del árbol (Avelar *et al.*, 2001).

Avelar (2001), encontró en el municipio de Calvillo, Aguascalientes, características de este síndrome asociadas al complejo *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* y los hongos *Fusarium solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Verticillium dahliae* y *Trichothecium roseum*. Naranjo y Cortés (1982) consideran a los nematodos los agentes patogénicos de mayor importancia para la zona de Calvillo, Aguascalientes.

2.4. Nematodos agalladores *Meloidogyne* spp.

Los nematodos del género *Meloidogyne* spp. son endoparásitos sedentarios, que inducen la formación de agallas en las raíces de las plantas hospedadoras, destacando su importancia en cuanto al daño en cultivos hortícolas, industriales, ornamentales y frutales (Bello *et al.*, 2000; Piedra Buena 2004). En este género se pueden distinguir un grupo de especies adaptadas a bajas temperaturas como es el caso de *M. hapla*, especies cuarentenadas como *M.*

chitwoodi y otro grupo de especies termófilas como *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* que se reportan parasitando fundamentalmente cultivos hortícolas, ornamentales, frutales e industriales (Bello *et al.*, 2010).

2.4.1. Características morfológicas del género *Meloidogyne*

Las hembras adultas presentan formas redondeadas a piriformes, blancas, sedentarias, de 295µm a 450µm de longitud, con un cuello corto que se proyecta, no presentan fase de quiste. En el extremo posterior la vulva y el ano están próximos, rodeados de un patrón cuticular característico (patrón perineal), que es diferente según la especie (Chitwood, 1949). Los fasmidios se abren en forma de poro, a cada lado del ano, levemente elevados. La cutícula es gruesa y estriada. El estilete es delgado, entre 12-15 µm, con nódulos basales pequeños. El poro excretor está por delante del bulbo medio, con frecuencia cercano a la base del estilete (Bello *et al.*, 2010).

Presentan dos ovarios, son prodélficas, y seis glándulas rectales de tamaño grande que segregan una sustancia gelatinosa en la cual se depositan los huevos, que no son retenidos dentro del cuerpo de la hembra. (Bello *et al.*, 2010).

El macho es vermiforme, de hasta 2 mm de longitud, con el extremo de la región posterior curvado. La cutícula es fuertemente estriada, con campos laterales con cuatro estrías longitudinales. La región labial es redondeado, poco prominente, con un disco labial marcado y pocas estrías (una a tres). Los sectores laterales son más anchos que los submedianos, asemejándose a “mejillas”. El estilete es robusto (18.3 µm) con nódulos basales grandes. Las glándulas esofágicas están situadas principalmente en posición ventral. Las espículas son delgadas, generalmente entre 25-33 µm de longitud, con el gubernaculum entre 7-11 µm de longitud. Tiene un testículo, o dos si hubo desarrollo sexual revertido. La región posterior es redondeada, con fasmidios como poros cerca de la abertura cloacal, que es subterminal. No presenta bursa (Bello *et al.*, 2010).

Los juveniles presentan diferente aspecto según el estadio. El J₁ tiene el término de la región posterior roma, realizando la muda dentro del huevo. El J₂ es vermiforme, posee capacidad migratoria, siendo el estado infectivo. La segunda y

tercera muda se realiza dentro de la cutícula del J2. El cuerpo es recto a arqueado en reposo, midiendo por lo general menos de 0,6 mm de longitud. La región anterior es generalmente redondeada con uno a cuatro estrías gruesas, un disco labial diferenciado y una estructura levemente esclerotizada. Los sectores laterales son más anchos que los submedianos. El estilete es delgado, de menos de 20 μm de longitud. El poro excretor está por detrás del hemizónidio. La región posterior tiene una porción hialina claramente visible, con la punta angosta e irregular en el contorno. El J₃ es sedentario, hinchado, con forma de “salchicha” y una región posterior corta y roma. El J₄ también es sedentario e hinchado, con el ano terminal (Bello *et al.*, 2010).

2.4.2. Ciclo biológico

El ciclo biológico de los nematodos del género *Meloidogyne* (Fig. 2) comienza con el huevo, lugar donde se desarrolla la primera de las cuatro fases juveniles (J₁). Dentro del huevo tiene lugar la primera muda, emergiendo como segundo estadio juvenil (J2), el cual posee capacidad migratoria y puede penetrar en los tejidos de la planta (fase infectiva). El estado J2 tiene energía suficiente para permanecer al menos un mes en la búsqueda y penetración de la raíz, estableciendo un sitio de alimentación. Al penetrar en la raíz éste se mueve intracelularmente, ingresando a la altura de la base del cilindro vascular y migrando hacia arriba.

En la zona de diferenciación de la misma se vuelve sedentario y establece un punto de alimentación permanente. Este punto de alimentación se forma en respuesta a las secreciones que el nematodo inyecta a las células del hospedante, las cuales inducen varias divisiones nucleares sin citoquinésis, dando lugar a células grandes, multinucleadas, llamadas “células gigantes”. Alrededor del lugar de alimentación las células de la planta se dividen e hinchan, lo cual se manifiesta externamente como nódulos (“agallas”). El nematodo ingiere el citoplasma de las células gigantes derivadas de la planta a través de sus estiletes, ya que estas células gigantes funcionan como fosas metabólicas que canalizan los recursos de la planta hacia el nematodo parásito. Posteriormente pasa por las dos fases

juveniles restantes (J_3 y J_4) hasta convertirse en adulto. Tanto el estadio J_2 como el adulto poseen un estilete, mientras que los estadios J_3 y J_4 pueden carecer de él (Orton Williams, 1973; Williamson Y Gleason, 2003).

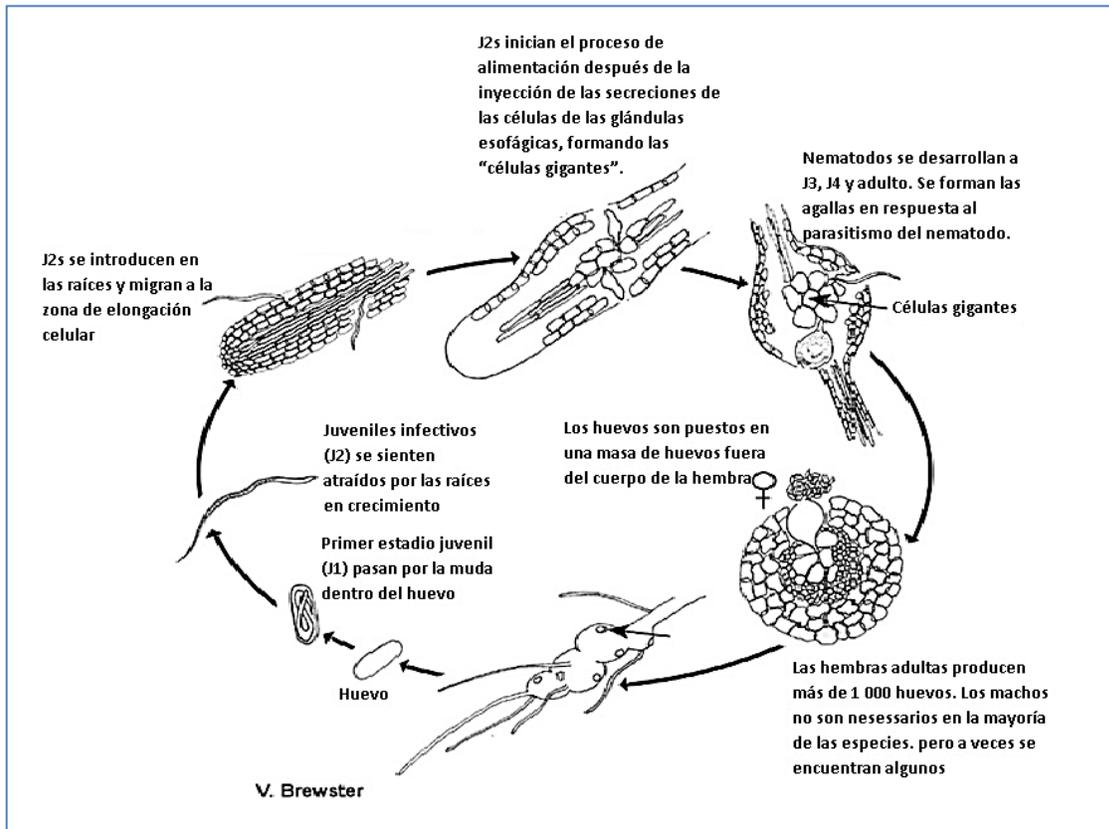


Figura 2. Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. (Tomado de: Mitkowski and Abawi, 2003.)

2.4.3. Distribución de *Meloidogyne* spp. en México

En México este nematodo se distribuye en gran parte del territorio nacional debido a su amplio rango de hospedantes y a la diversidad de cultivos de nuestro país (Cid del Prado *et al.*, 2001). 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 (*Cesolia argentea* L.), crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Hemsl), chinito (*Impatiens balsamina* L.), epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.), fresa (*Fragaria* spp.), jitomate (*Solanum esculentum*), lechuga (*Lactuca sativa* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), pino

(*Pinus hartwegii* Lindt), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y zanahoria (*Dacus carota* L.); *M. incognita* en los estados de Baja California Norte, Colima, Chiapas, Durango, 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* L.), chayote (*Sechium edule* (Lacq)Swl), chile (*Capsicum annum* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris*), garbanzo (*Cicer arietinum* L.), jitomate (*S. esculentum*), maíz (*Zea mays* L.), melón (*Cucumis melo* L.), papa (*Solanum 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, Colíma, 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).

2.5. Biofumigación o biodesinfección de suelos

La biofumigación y la biodesinfección de suelos se diferencian del uso de enmiendas orgánicas por las características especiales que deben tener los materiales utilizados como biofumigantes, la dosis y el método de aplicación. En primer lugar, para que un material orgánico tenga función biofumigante o biodesinfectante debe estar en vías de descomposición, lo cual no sucede con la materia orgánica que se suele agregar normalmente como abono (Bello *et al.*, 2003), que constituye materia orgánica estabilizada (composta o estiércoles “maduros”).

Además, el método de aplicación debe favorecer estos procesos de descomposición, así como la necesidad de retener los gases que se producen durante la descomposición de la materia orgánica. Esto se debe lograr por un periodo mínimo de dos semanas, ya que el efecto de los gases es en la mayoría

de los casos bioestático, lo que hace necesario prolongar en el tiempo de acción sobre los patógenos (García *et al.*, 2004).

La biofumigación o la biodesinfección de suelos se basan en los procesos o sustancias volátiles resultantes de la descomposición de las enmiendas orgánicas y residuos agroindustriales como fumigantes para el control de los organismos patógenos de vegetales (Kirkegaard *et al.*, 1993; Bello, 1998). El efecto de la biofumigación sobre la actividad microbiana es selectivo favoreciendo a los antagonistas y disminuyendo el nivel de los nematodos. Por una parte la susceptibilidad de los patógenos a los compuestos volátiles que se desprenden durante la descomposición de la materia orgánica aumenta al elevarse la temperatura del suelo y por otra, al agregar materia orgánica se incrementa entre 2-3 °C la temperatura de solarización, así como la profundidad del suelo a la cual llega el tratamiento (Bello *et al.*, 2001).

2.5.1. Biodesinfección de suelos

El aporte de materia orgánica al suelo para aumentar la fertilidad y manejar los patógenos es una práctica que se ha realizado desde el inicio de la agricultura, logrando efectos positivos tanto físicos, químicos y biológicos. Se ha probado una amplia gama de materiales para ser utilizados como enmiendas orgánicas en el manejo de nematodos fitoparásitos, hongos fitopatógenos y plantas arvenses (Bello *et al.*, 2010). En suelos infestados con nematodos fitoparásitos la incorporación de materiales orgánicos ha mostrado ser un método de control satisfactorio, con una eficacia dependiente de la descomposición química y las propiedades físicas del material, que determinan el tipo de microorganismos involucrados en su descomposición en el suelo y los productos que se obtendrán de esta descomposición (Bello *et al.*, 2010).

Para evitar efectos fitotóxicos sobre el cultivo sin perder actividad biocida Rodríguez-Kabana (1986,1996) recomienda el uso de las enmiendas orgánicas con una relación C/N entre 8-20. El efecto nematicida de la materia orgánica se produce a través de diversos mecanismos, estudios realizados indican que el efecto nematicida de las enmiendas puede provenir de la liberación de

compuestos tóxicos para los nematodos, así como la función que la materia orgánica tiene en el suelo, por ser un sustrato que favorece el desarrollo de la microfauna y microflora, llegando incluso a favorecer el incremento de microorganismos antagonistas (Bello *et al.*, 2010). Durante la descomposición de la materia orgánica se liberan una gran cantidad de productos químicos que realizan el control de los patógenos del suelo, entre estos compuestos se encuentran amoníaco, nitratos, sulfuro de hidrógeno, ácidos orgánicos, sustancias orgánicas volátiles, enzimas, fenoles, etc. (Barres *et al.*, 2006).

2.6. Generación de compuestos nematicidas durante la degradación de materiales orgánicos

Muchas enmiendas orgánicas que no contienen fitoquímicos nematicidas pre-existentes liberan compuestos durante su degradación o descomposición en el suelo. Dichas enmiendas incluyen varios abonos verdes, estiércol de animales y materiales con alto contenido de nitrógeno (Oka, 2010).

2.6.1. Compuestos derivados de los glucosinolatos

El cultivo y la incorporación de cultivos de cobertura/rotación, especialmente plantas de la familia Brassicaceae, suprime enfermedades del suelo incluyendo los nematodos. La utilización de compuestos volátiles tóxicos, como los isociocianatos generados de los glucosinolatos en éste tipo de plantas para el control de enfermedades del suelo suele llamarse Biofumigación (Kirkegaard *et al.*, 1993). Los isociocianatos son conocidos por poseer una amplia actividad pesticida contra malezas, hongos, bacterias y nematodos (Matthiessen and Kirkegaard, 2006).

Los nitrilos son otro grupo de compuestos tóxicos derivados de los glucosinolatos. Los nitrilos simples han demostrado estar involucrados en la defensa directa e indirecta de las plantas sobre el ataque de *Pieris rapae* (Lepidoptera) (Mumm *et al.*, 2008). Sin embargo el papel de los nitrilos en la supresión de los nematodos no es claro (Oka, 2010).

2.6.2. Ácidos orgánicos

Los nematodos son frecuentemente eliminados en los campos inundados. Además del agotamiento del oxígeno, se cree que varios compuestos que son tóxicos para los nematodos se generan en la inundación. Los compuestos nematicidas más estudiados que se generan por la descomposición de las enmiendas orgánicas en suelos saturados son los ácidos grasos de cadena corta, incluyendo acético, butírico, fórmico y propiónico (Johnston, 1959; Patrick *et al.*, 1965; Sayre *et al.*, 1965). Estos ácidos orgánicos generalmente son producidos por la fermentación de materia orgánica rica en carbono por microorganismos bajo condiciones anaeróbicas. Una población de *Tylenchorhynchus martini* fue reducida debido a la concentración de los ácidos grasos de cadena corta generados por la actividad microbiana de bacterias anaeróbicas *Clostridium butyricum* (Johnston, 1959). Estos y otros ácidos orgánicos también se han identificado en la descomposición de materia orgánica, en cultivos tales como el centeno (*Secale cereale*), pasto forrajero (*Phleum pratense*), salvado de arroz, glucosa y melazas, y encontrándose que estos materiales son tóxicos para los nematodos parásitos de plantas (Patrick *et al.*, 1965; Sayre *et al.*, 1965; Taba *et al.*, 2006) y otros patógenos del suelo (Kubo *et al.*, 2005; Momma *et al.*, 2006). En particular el ácido butírico ha sido probado como una alternativa a los fumigantes sintéticos del suelo para el control de nematodos y hongos fitopatógenos (Browning *et al.*, 2004, 2006; McElderry *et al.*, 2005).

Otra fuente de ácidos grasos de cadena corta en las enmiendas orgánicas es el estiércol de animales, tales como: el ácido acético, propiónico, butírico, ácido isovalérico y caproico, éstos ácidos fueron responsables de la mortalidad de microesclerocios de *Verticillium dahliae*, se generaron cuando el estiércol líquido de cerdos se acidificó o al agregarse en suelos ácidos (Tenuta *et al.*, 2002; Conn *et al.*, 2005). Una suspensión tomada de un digestor anaeróbico de estiércol y el estiércol líquido de cerdo tuvo efectos supresores sobre *Pratylenchus penetrans* y *Heterodera glycines* respectivamente. Este efecto supresor se le atribuyó a los ácidos grasos volátiles (Min *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2007).

2.6.3. Compuestos nitrogenados

Se encontró una relación lineal negativa entre el contenido de nitrógeno en abonos orgánicos aplicados al suelo y la infestación de plantas por nematodos (Rodríguez-Kábana *et al.*, 1987). Se encontró una relación positiva entre la relación carbono-nitrógeno de las enmiendas (C / N) y la infestación de nematodos en las plantas (Rodríguez-Kábana *et al.*, 1987). Compuestos nitrogenados, principalmente amoníaco (NH_3) son generados a partir de materiales orgánicos con baja relación C/N en el suelo. Un ejemplo de éste tipo de enmiendas son los estiércoles de animales (Kaplan y Noe, 1993; Lazarovits *et al.*, 2000; Riegel y Noe, 2000; Oka *et al.*, 2007). Otros materiales orgánicos con alto contenido de nitrógeno son pastas de aceite, harina de algodón, exoesqueletos de cangrejos, harina de plumas, harina de huesos, harina de sangre, harina de cuernos y micelio fúngico, entre otros (Walker, 1971; Rodríguez-Kábana, 1986; Stirling, 1991). El amoníaco se genera a partir de la materia orgánica que se descompone por los microorganismos del suelo, y se sabe que juega un papel importante en la supresión de los nematodos parásitos de las plantas y los hongos por un tiempo relativamente corto (unos pocos días a semanas, dependiendo del ambiente del suelo) después de la aplicación (Rodríguez-Kábana, 1986, Rodríguez-Kábana *et al.*, 1987; Spiegel *et al.*, 1987; Oka *et al.*, 1993; Lazarovits *et al.*, 2000; Tenuta y Lazarovits, 2002).

Cuando se calcularon las concentraciones de amoníaco nematicida basado en concentraciones de amonio y/o el pH de la solución del suelo, la exposición de los juveniles *M. javanica* a 40 a 70 mg de $\text{NH}_3 - \text{N kg}^{-1}$ en el suelo durante 7 días reduce en gran medida el número de los juveniles recuperados (Oka *et al.*, 2006), y la exposición de los juveniles a amoníaco a $9.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 40 horas fue letal para el 95 % de la población de nematodos (Oka *et al.*, 1993).

2.6.4. Compuestos derivados de Glucósidos

Varias plantas gramíneas son conocidas por suprimir poblaciones de nematodos cuando éstas son incorporadas al suelo como abono verde. El pasto sudán y el sorgo como forraje producen un glucósido cianogénico (Dhurrin) que se degrada en cianuro de hidrógeno con alto efecto nematicida, controlando *Meloidogyne hapla* (Widmer y Abawi, 2000, 2002). Una correlación entre las reducciones en las raíces agalladas causada por *M. hapla* y contenidos de cianuro de hidrógeno fue observada en híbridos de sorgo y pasto sudán (Widmer y Abawi, 2002). Otras plantas cianogénicas, como el trébol blanco (*Trifolium repens*) y el lino (*Linum usitatissimum*), son igualmente efectivos en la reducción de agallas radiculares. Otra fuente de glucósidos cianogénicos que se puede utilizar en el control de nematodos es la yuca o mandioca (*Manihot esculenta*) sus raíces contienen linamarina. El líquido de las raíces de Cassava producto del procesamiento ha sido usado para el control de nematodos en Brasil (Oka, 2010).

En el centeno, los ácidos hidroxámicos cíclicos ocurren como glucósidos, que son rápidamente hidrolizados por β -glucosidasa, liberando ácidos hidroxámicos sobre los tejidos. Una alta mortalidad de juveniles de *M. incognita* y mezcla de estadios de *Xiphinema americanum* fue obtenido en ensayos in-vitro por la exposición de algunas soluciones de ácidos hidroxámicos a una concentración de $90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Las concentraciones de dichos compuestos nematicidas pueden servir como un indicador potencial en la selección de variedades de centeno para el control de nematodos (Oka, 2010).

2.6.5. Otros compuestos

Muchos compuestos volátiles y no volátiles son conocidos por ser generados de la descomposición de enmiendas orgánicas ya sea bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas del suelo. Los compuestos que contienen azufre, tales como CH_3SH , $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ y $(\text{CH}_3)_2\text{S}_2$, fueron detectados en enmiendas como los residuos de col. Bajo condiciones anaeróbicas del suelo pueden ser acumulados, bióxido de carbono, etileno, hidrógeno, metano, ácidos orgánicos, alcoholes, sulfuro de dimetilo y aldehídos (Oka, 2010).

El cultivo y la incorporación del híbrido mijo perla variedad CFPM 101 (*Pennisetum glaucum*) fue eficaz para controlar *Pratylenchus penetrans* sobre el tabaco curado al aire caliente (Flue-cured-tobacco). Además para la pobre condición del hospedante para los nematodos, el cultivar mijo perla contiene mayores concentraciones y cantidades de compuestos que contienen azufre, que pueden desempeñar un papel importante en la supresión de los nematodos. Entre los compuestos que contienen azufre está el Sulfuro de hidrógeno (H₂S), generados a partir de campos de arroz inundados, el cual fue encontrado que tiene actividad nematicida (Oka, 2010).

2.7. Hongos nematófagos

Los hongos nematófagos tienen la capacidad de infectar, matar y digerir estados de vida de los nematodos parásitos (huevos, juveniles y adultos). Estos hongos habitan la mayoría de los suelos (Barron, 1977). Algunos de los hongos nematófagos son parásitos facultativos y pueden crecer saprofiticamente en el suelo. En presencia del hospedero ellos pueden cambiar de un estado saprofito a parasítico y formar estructuras de infección, órganos de captura, hifas o apresorios. Estas estructuras de infección varían dependiendo del tipo de nematodo hospedero, hongo o planta (López -Llorca *et al.*, 2006.).

2.7.1. Hongos Parásitos de Nematodos

Los hongos nematófagos pueden ser divididos en cuatro grupos dependiendo en su modo de atacar a su hospedero. Los primeros tres grupos infectan nematodos vermiformes (juveniles y adultos), mientras que el cuarto grupo infecta hembras de nematodos y huevos (Jansson y López-Llorca, 2001). Los hongos nematófagos atrapadores usan varios tipos de órganos trampa formados en sus hifas, redes adhesivas, protuberancias adhesivas o anillos constrictores; éstos hongos son parásitos facultativos de varias extensiones. Los nematodos son capturados en las trampas formadas por el hongo ya sea por adhesión o funciones mecánicas. En los hongos endoparásitos, las esporas

(conidios) funcionan como estructuras de infección, ya sea que se adhieran a la cutícula del nematodo o que sea ingerido. Estos hongos son generalmente parásitos obligados de nematodos. Los hongos que producen toxinas, por ejemplo el champiñón ostra que descompone la madera, intoxica al nematodo antes de penetrarlo. La infección por lo general se lleva a cabo a través de apresorios. Es común que todos los tipos de hongos nematófagos después del contacto con la cutícula de nematodos, o corion del huevo se lleva a cabo la penetración, seguido por la digestión de los contenidos resultantes en la formación de nueva biomasa fúngica en el interior, y luego fuera del nematodo (López-Llorca *et al.*, 2006).

2.7.2. *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams = *Verticillium chlamydosporium* Goddard.

El hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* es un parásito facultativo de etapas sedentarias de los nematodos parásitos de plantas. Ha sido asociado con la supresión de nematodos del suelo, como un agente natural de control de nematodos formadores de quistes y agalladores, es considerado como agente con alto potencial de control biológico en suelos infestados con nematodos (Kerry y Bourne, 2002).

Una estrategia de biomanejo plantea el uso combinado de *P. chlamydosporia* con métodos culturales incluyendo el uso de cultivares resistentes, constituyendo una oportunidad al manejo alternativo de los nematodos logrando reducir el uso de nematicidas. El propósito de la estrategia comprende la aplicación del hongo con el uso de plantas hospederas trampa para el nematodo antes de sembrar cultivos más susceptibles. Por lo que aun en altas poblaciones de nematodos solo se forman agallas pequeñas en las raíces y las hembras producen masas de huevos, las cuales están expuestas a la infección por el hongo en la rizósfera y el control es maximizado. Pruebas en pequeñas parcelas en condiciones controladas, la estrategia ha resultado en la reducción de infestación por los nematodos agalladores > 85% (Kerry y Bourne, 2002).

2.7.3. Taxonomía y rango de hospederos

Pochonia chlamydosporia es un hongo imperfecto (Ascomycota:Hypocreales), parasito facultativo de huevos de nematodos formadores de quistes y formadores de agallas a lo largo del mundo. El hongo también ha sido encontrado en huevos de caracoles y se considera que tiene potencial como agente de control biológico contra algunos hongos patógenos en el suelo como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., y *Phytophthora capsici*. (Kerry and Bourne., 2012).

2.7.4. Aislamiento y reproducción

Colonias de *Pochonia chlamydosporia* pueden ser obtenidas de suelo y raíces utilizando un medio semiselectivo en el que el hongo puede ser fácilmente identificado. Forma colonias blancas algodonosas con bordes regulares. Las células conidiógenas son producidas ensemiselectivo forma individual sobre la hifa vegetativa o en ramilletes sobre conidióforos erectos. Las conidias se encuentran arregladas en cadenas o cabezuelas dependiendo de la variedad de *Pochonia chlamydosporia*. El hongo no produce clamidosporas en éste medio selectivo. La siembra de cultivos monosporicos en un medio nutritivo Papa-Agar favorece la producción de clamidosporas (Kerry y Bourne, 2002).

2.8. JUSTIFICACIÓN

En México se cultivan alrededor de 21, 235 hectáreas de guayabo, la región del oriente de Michoacán cubre 8,324 hectáreas. En todas las áreas guayaberas del país se presentan los nematodos del género *Meloidogyne* spp., causantes de agallamiento severo en las raíces, lo que constituye una limitante para la absorción de agua y nutrientes, además que facilita la invasión de otros patógenos del suelo como son los hongos *Fusarium solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Verticillium dahliae* y *Trichotecium roseum*, causando fuertes pudriciones en las raíces que se manifiesta en muerte descendente de ramas y/o muerte del árbol. El desconocimiento sobre la presencia de los nematodos agalladores y su manejo han ocasionado el uso indiscriminado de productos químicos con propiedades nematicidas de alta toxicidad, causando fuerte disturbio en la microflora y microfauna del suelo, e induciendo resistencia en los organismos fitopatógenos, además de causar un impacto negativo en el ambiente.

Es necesario la implementación de alternativas de manejo como las que se presentan en ésta investigación, donde se hace uso de abonos orgánicos y del hongo nematófago *Pochonia clamydosporea* como biocontrolador de huevos de *Meloidogyne arenaria*, con estas estrategias se busca disminuir el uso excesivo de los fertilizantes químicos, proporcionar las condiciones adecuadas para que los enemigos naturales de *M. arenaria* se desarrollen y se favorezca la reducción de la población de éstos nematodos. Se trata de una estrategia que es respetuosa con el ambiente y que además puede ser redituable para los productores de guayaba.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la eficiencia de diferentes agregados orgánicos y del hongo *Pochonia chlamydosporia* como agentes reguladores de la población del nematodo agallador *Meloidogyne arenaria*, y la respuesta de las plantas de guayabo a éste manejo alternativo.

Objetivos particulares:

- Identificar las especies de *Meloidogyne* presentes en los huertos de experimentación.
- Obtención de aislamientos nativos de *Pochonia chlamydosporia* en la zona de estudio, para utilizarlas como posibles agentes de control biológico de los nematodos agalladores.
- Evaluar la eficiencia en la reducción de la población del nematodo agallador y la respuesta de la planta, a diferentes agregados orgánicos y *Pochonia chlamydosporia* como agentes de manejo biológico de *Meloidogyne* spp.

IV. HIPÓTESIS

- Los huertos de guayaba donde se lleva a cabo la presente investigación están infestados por más de una especie de *Meloidogyne*, causando severos daños.
- Se encontrarán diferentes aislamientos de *Pochonia chlamydosporia* en el área de estudio.
- El uso de agregados orgánicos y de *Pochonia chlamydosporia* reducirá significativamente las poblaciones de los nematodos agalladores.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Áreas de estudio y su localización

Se establecieron dos huertos de experimentación situados en la región del oriente del estado de Michoacán, México. El primero se encuentra localizado en el municipio Benito Juárez en la comunidad “cerro colorado” (19°18.914’ Latitud Norte, 100°20.677 Latitud Este) a una altura de 1202 msnm. El segundo huerto se localiza en el municipio de Jungapeo en la comunidad “la florida” (19°21.491’ Latitud Norte, 100°30.002’ Latitud Este) a una altura de 1176 msnm.

5.2. Identificación de las especies de *Meloidogyne*

Se tomaron diez submuestras de raíces de árboles de guayabo del lote de experimentación correspondiente para posteriormente homogenizarlas y tomar 200 g de raíz. Éstas fueron teñidas mediante el método de Hipoclorito de sodio-fucsina ácida al 30% (Bezooijen, 2006).

Se realizó la disección de raíces y la extracción de hembras maduras con el uso de agujas de disección, pincel fino y un microscopio estereoscópico. Cada hembra se depositó en una pequeña gota de glicerina en un porta objetos y se procedió a cortar la zona perineal de éstas con la ayuda de una navaja de un solo filo (tipo Rep. Cortador OMX) y un microscopio de disección. Los cortes perineales se colocaron en un porta objetos con una gota de lactofenol y un anillo de cera, se le colocó el cubre objetos, después se calentó hasta sellar la preparación. Las preparaciones se observaron en un microscopio (400X) compuesto para poder ver las características morfológicas de la zona perineal que permitió la identificación de la especie (Hartman y Sasser, 1985).

5.3. Muestreo y colecta de material para realizar el aislamiento de *P. chlamydosporia*.

Se colectaron raíces y suelo de árboles de guayabo (*Psidium guajava* L.) que se encuentran en el municipio de Jungapeo, Michoacán México (19° 20’350”

Latitud Norte y 100° 12'001' Latitud Este) con síntomas aéreos y nodulaciones en las raíces que indicaban la presencia de *Meloidogyne* sp. Los primeros diez centímetros de suelo fueron removidos, las muestras de suelo y raíz se tomaron a partir de los 30 cm de profundidad del área de goteo de diferentes árboles sintomáticos para realizar una mezcla del material (Cepeda *et al.*, 2003) y fueron depositadas en hieleras para ser trasladados inmediatamente al laboratorio de nematología en el Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

5.4. Aislamiento de *P. chlamydosporia* a partir de raíces de guayabo.

De raíces colectadas de diferentes árboles de uno o dos mm de diámetro se cortaron en trozos de 1cm de longitud y se mezclaron para posteriormente tomar 1g del material y depositarlo en un mortero previamente esterilizado, se maceraron las raíces adicionándole 9 ml de Agua-Agar (A-A) al 0.5%, después se tomó 1 ml de la mezcla y se diluyó en 9 ml de A-A formando una dilución de 1×10^{-1} , el procedimiento se repitió para obtener una dilución de 1×10^{-3} de donde se tomaron 0.2 mL que se distribuyeron de manera homogénea con la ayuda de una varilla de vidrio en las cajas Petri con el medio semiselectivo (Hidalgo *et al.*, 2000). Las cajas fueron incubadas en una estufa durante 10 días a una temperatura constante de 27 °C (Hidalgo *et al.*, 2000).

5.5. Aislamiento de *P. chlamydosporia* a partir de suelo de la rizósfera de guayabo

Las submuestras de suelo se homogeneizaron para tomar 1 g de éste y macerarlo en un mortero previamente esterilizado adicionándole 9 mL de Agua Agar (A-A) al 0.5%, después se tomó 1 mL de la mezcla y se diluyó en 9 mL de A-A formando una dilución de 1×10^{-1} , el procedimiento se repitió para obtener una dilución de 1×10^{-3} de donde se tomaron 0.2 mL que se distribuyeron de manera homogénea con la ayuda de una varilla de vidrio en las cajas Petri con el medio semiselectivo (Apéndice 1) (Hidalgo *et al.*, 2000).

5.6. Identificación cultural y Morfológica de *P. chlamydosporia*

Una vez que se observaron crecimientos característicos del hongo, colonias blancas, algodonosas en el medio semiselectivo, se transfirieron a cajas Petri con medio Papa agar y se incubaron durante diez días a 27° C (Hidalgo *et al.*, 2000). Posteriormente con la ayuda de un microscopio compuesto (400x) se observaron las estructuras del hongo como es la disposición de los conidióforos y la presencia de dictioclamidosporas (Fig. 3) y utilizando las claves de identificación se buscó determinar el género y la especie (Gams, 1988). Para determinar la variedad a la que pertenecía el hongo se utilizaron las claves de Kerry y Bourne, 2002; Gams, 1988.

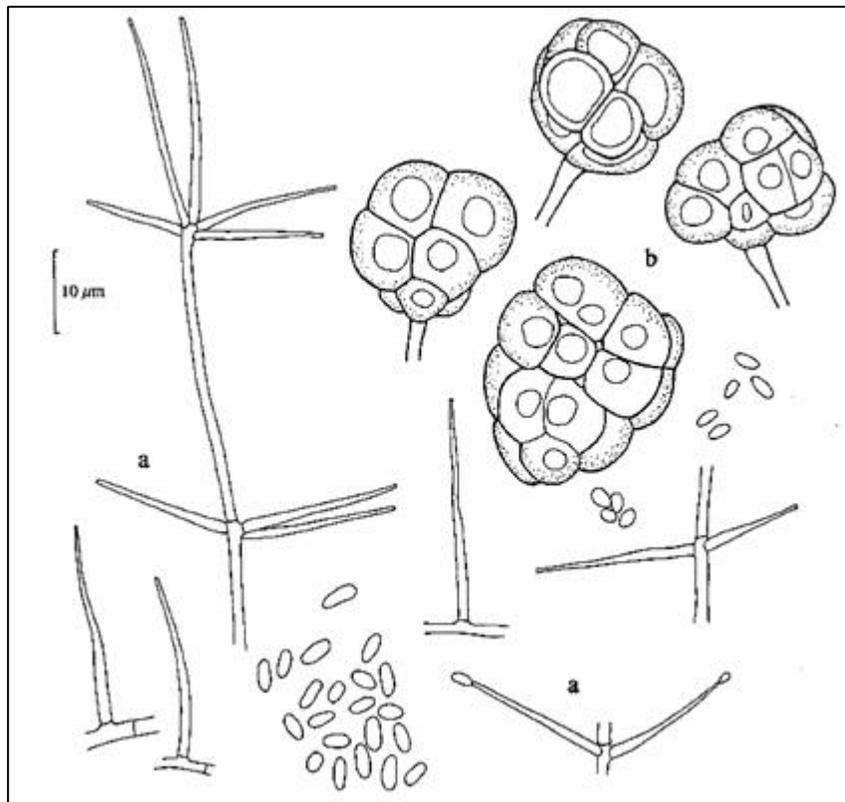


Figura 3. *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. a)= Conidióforos verticilados y simples b)=Dictioclamidosporas (Gams, 1988).

5.7. Identificación Molecular de *P. chlamydosporia*

5.7.1. Extracción de ADN

El aislamiento obtenido de raíz fue sometida a extracción de ADN para corroborar que se trataba del hongo *Pochonia chlamydosporia*, tomando un aislamiento con crecimiento de 10 días en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) suplementado con el antibiótico sulfato de estreptomicina. El ADN genómico fue extraído utilizando el protocolo CTAB (Bromuro de Cetil-Trimetil Amonio). El ADN fue almacenado a -3 °C posterior a su extracción.

5.7.2. Amplificación y secuenciación

Las condiciones de PCR para preparar una mezcla a 5X fue de 25 µL de buffer, 15 µL de MgCl, 5 µL de DNTPs, 2.5 µL de taq polimerasa, 10 µL de primer ITS4 (3' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 5'), 10 µL de primer ITS5 (3' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 5'), 25 µL de DNA y 157.5 µL de agua. El producto de amplificación fue observado realizando un gel de agarosa al 2%, 2 µL del producto de PCR (ADN amplificado), 1 µL de colorante, por carga de muestra, colocando finalmente el buffer de carga y bromuro de etidio. Posteriormente el gel se observó en un transiluminador (Medina-Canales, 2013).

5.8. Reproducción masiva del Hongo

Este procedimiento se realizó siguiendo una variante de la metodología propuesta por Pérez *et al.* (2010), en la que mencionan dos etapas (proceso bifásico), la primera consiste en la fermentación líquida, en donde se usa una infusión del sustrato (arroz o maíz) y la segunda una fermentación sólida.

5.8.1. Fermentación líquida

En este caso se realizó utilizando un medio nutritivo sintético (Caldo Dextrosa Sabouraud (BIOXON) en lugar de la infusión de arroz. Se toman 65 g del medio y se diluye en 1 L de agua destilada y se mezcla hasta obtener una suspensión uniforme. Esta se distribuye en matraces de 250 mL que se esteriliza

durante 15 min a 121 °C. Se dejan enfriar y a cada matraz se le añade una solución de antibióticos (Cloranfenicol 50mg L⁻¹, Sulfato de estreptomicina 50 mg L⁻¹, Clorotetraciclina 50 mg L⁻¹). Los matraces se inoculan con cuatro discos de 0.5mm del hongo crecido en Papa agar durante 20 días, Se incubaron durante tres días a 27°C en agitación constante a 130 rpm en una agitadora mecánica (marca: Thermo Scientific, Modelo SHKA4000-7).

5.8.2. Concentración de inóculo

El siguiente paso fue realizar la determinación de la concentración de conidios por matraz, para esto se requiere el uso de la cámara Neubauer. La concentración ideal de una suspensión de conidios para su conteo es 1×10^6 a 1×10^7 por lo tanto fue necesario utilizar un factor de dilución (FD) de 100, se realizaron varias diluciones en agua destilada + tween 80 al 0.3% y obtener la concentración deseada (Lacey and Brooks, 1997).

Con la ayuda de una micropipeta se tomó 1µL de la suspensión de conidios (10^{-2}), se procedió a contar los conidios en cinco cuadrantes de cada cámara, se realizó un mínimo de 5 conteos y finalmente se obtuvo el promedio de conidios (Lacey and Brooks, 1997).

Concentración de conidios por mL del matraz.

La concentración de conidios por mL se calculó usando la fórmula de Lipa y Slizynski (1973):

$$\text{No. de UI/mL} = \sum X (4 \times 10^6) (FD) / 80$$

UI= Unidades infectivas o conidios por mL

X= Sumatoria del promedio de todos los conteos.

$(4 \times 10^6) / 80$ = Es una constante que corresponde a 50000

FD= Factor de dilución y puede ser 10, 100, 1000 dependiendo del número de diluciones que se hayan realizado.

Una vez determinada la concentración por mL se calculó la concentración requerida para inocular el sustrato sólido.

$$X = \frac{\text{Concentración requerida} \times \text{Volumen final necesario}}{\text{Concentración contada}}$$

X= Número de mL de la suspensión de conidios agregados para obtener 10 mL (Lacey and Brooks, 1997).

La determinación de la concentración de conidios es un proceso necesario debido a que en la fermentación sólida se requiere inocular el sustrato con 20mL de la suspensión con de 1×10^4 conidios/mL (Pérez *et al.*, 2010).

5.8.3. Fermentación Sólida

Este proceso generalmente se lleva a cabo en granos de arroz o en maíz quebrado, ambos constituyen un sustrato favorable para la obtención de clamidosporas de *P.chlamydosporia*. El maíz quebrado se deposita en una bolsa de malla de plástico y se procede a lavar con agua de la llave hasta que el agua que escurre ya no tenga un tono lechoso como en el inicio del proceso (Pérez *et al.*, 2010).

Una vez limpio el maíz se dejó escurrir y se extendió en una lona de plástico a la sombra hasta que pierda el excedente de humedad. . Después, cuando el maíz contenía 20% de humedad se colocó en bolsas de polipapel de 250g, sellándolas con grapas para proceder a su esterilización en el autoclave por 20 min a 121°C (Pérez, 2004). Las bolsas se dejan enfriar y a las 24 horas se pudo iniciar la inoculación del hongo con la ayuda de una jeringa autorecargable (30mL), se le inyectaron a cada bolsa 30 mL de suspensión de inóculo a una concentración de 1×10^4 UFC. El inóculo se homogenizó en el sustrato de cada

bolsa por agitación o frotación del mismo, para posteriormente incubarlas durante 21 días a 27 °C (Pérez *et al.*, 2010).

5.9. Pruebas de *P. chlamydosporia* como agente de control biológico

5.9.1. Prueba de parasitismo sobre huevos de *Meloidogyne arenaria*.

5.9.1.1. Colecta de huevos

Siguiendo la metodología de Vrain (1977), se tomaron raíces delgadas de guayabo infectadas con *Meloidogyne* sp se lavaron moderadamente con agua. Posteriormente se cortaron en trozos de 2-5 cm de longitud y se mezclaron, éstas se depositaron en un recipiente de vidrio con tapa que contenía cuatro litros de solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.53% a una temperatura de 23°C y se procedió a agitar fuertemente por 3 minutos. La mezcla se pasó por los tamices de 60, 100, y 400 mallas de manera conjunta para que finalmente en el tamiz de 400 mallas la suspensión colectada se enjuagara con agua limpia hasta eliminar los residuos de NaClO, procediendo a colectar lo suspendido, para después observarlo bajo el microscopio de disección y corroborar que hubo colecta de huevos.

5.9.1.2. Parasitismo de huevos.

Colonias de *P.chlamydosporia* de 21 días de crecimiento en medio Papa-Agar y antibióticos se le agregaron 5 ml de agua destilada estéril, y se raspó el inóculo, de ésta suspensión se tomó 0.2 mL y se depositaron en cajas Petri con medio Papa-Agar y antibióticos, posteriormente se incubaron durante dos días a 25°C. (Hidalgo *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2012). Se corroboró el crecimiento del hongo y se depositó una suspensión de 300 huevecillos distribuidos homogéneamente en la caja Petri y nuevamente se incubaron durante 4 días a 25°C.

La estimación del porcentaje de parasitismo de huevos se realizó contando la presencia o ausencia del hongo en 100 huevos de manera aleatoria con la ayuda de un microscopio compuesto (Hidalgo *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2012).

5.9.1.3. Producción de clamidosporas

A los 20 días de inoculadas las bolsas con el maíz inoculado, y colonizado por *P. chlamydosporia* se pesaron, después se tomó 1 g de maíz colonizado por el hongo, y se suspendió en 9 mL de una solución de agua- agar (0.05%), se agito en un Vortex. Con una micropipeta se tomaron 10 μ L de la suspensión y se contaron en un hematocitometro, determinando el número de clamidosporas, éste procedimiento se repitió cuatro veces, se estimó un promedio y se calculó el número de clamidosporas en 1g del sustrato colonizado para finalmente extrapolar y conocer la concentración total de clamidosporas en cada bolsa (Kerry and Bourne, 2002 modificado).

5.10. Enmiendas orgánicas

Los materiales que se utilizaron fueron gallinaza, vermicomposta y alfalfa molida, fueron elegidos principalmente por su disponibilidad en la región donde se realizó el experimento, éstos fueron evaluados previamente en el proyecto generado en la región en donde se consideraron cuatro niveles de N* (0, 40, 80 y 120 kg/ha). En base al porcentaje de contenido de N y otras características químicas (Cuadro 3) de los materiales orgánicos que se usaron, se realizaron los cálculos para determinar la cantidad que se requería aplicar por cada árbol. En la presente investigación se decidió tomar el más alto nivel de nitrógeno evaluado ya que fue donde los árboles respondieron de la mejor manera.

Para determinar la composición química del material utilizado como enmiendas orgánicas, se tomaron pequeñas muestras y se enviaron al laboratorio "Fertilab" y así calcular las cantidades de cada material a aplicar (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición química de los materiales orgánicos.

	H ₂ O	N	P	K	Ca	Mg	Zn	Mn	Fe	Rel.	Min.
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	C/N	(%)
GA	18	3.7	2.2	2.8	5.7	1.0	500	474	4900	11	80
VC	22	2.5	0.8	1.9	8.0	1.5	600	450	3800	12	40.
AM	16	3.0	0.3	1.9	1.3	0.3	400	300	493	13	60

GA= Gallinaza; VC= Lombricomposta. AM= Alfalfa molida

H₂O= Humedad; N,P,K,Ca y Mg = Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio y Magnesio totales; Zn, Mn y Fe = Zinc, Manganese, y Hierro totales; Re. C/N= Relación Carbono Nitrógeno; Min.= Porcentaje de mineralización anual de los abonos orgánicos.

5.10.1. Cálculo de cantidad de abono orgánico por árbol

Se consideraron la cantidad de N por hectárea que se desea utilizar (120 kg de N min·ha⁻¹), el porcentaje de mineralización, el porcentaje de nitrógeno en el material orgánico, contenido de humedad y el número de árboles por hectárea en la parcela que para éste caso fueron 364 (Pratt *et al.*, 1973).

Los cálculos se realizaron siguiendo la metodología de Pratt *et al.* (1973).

$$\frac{\text{Nitrógeno requerido por hectárea}}{\text{Mineralización}} = \text{Kg de Nitrógeno orgánico} \cdot \text{ha}^{-1}.$$

$$\frac{\text{kg de nitrógeno orgánico} \cdot \text{ha}^{-1}}{\text{Nitrógeno en el material orgánico}} = \text{Kg de abono orgánico seco necesario} \cdot \text{ha}^{-1}.$$

$$\frac{\text{kg de abono orgánico seco necesario} \cdot \text{ha}^{-1}}{1 - \text{humedad del abono orgánico}} = \text{Kg de abono orgánico húmedo necesario} \cdot \text{ha}^{-1}.$$

$$\frac{\text{kg de abono orgánico húmedo necesario} \cdot \text{ha}^{-1}}{\text{Número de árboles} \cdot \text{ha}} = \text{Kg de abono orgánico} \cdot \text{árbol}.$$

5.10.2. Aplicación de los abonos orgánicos.

Se aplicaron 13.5 kg, 42 kg y 21.8 kg de gallinaza, vermicomposta y alfalfa molida respectivamente a cada árbol con el tratamiento correspondiente.

Se realizaron cajetes de manera manual a cada árbol utilizando palas para posteriormente depositar la enmienda (Fig. 4, A, C) y tapar con el suelo (Fig. 4, B) a manera de provocar la retención de gases que se liberan en la descomposición de los materiales orgánicos e inducir el efecto nematicida; el suelo debe estar previamente humedecido ya que ayuda a la retención de los diferentes compuestos liberados (Bello *et al.*, 2010).



Figura 4. Aplicación de tratamientos. Vermicomposta, **B)** Cubierta de suelo, **C)** Alfalfa molida, **D)** Maíz con *P. chlamydosporia*.

5.11. Aplicación de *P. chlamydosporia*

Se realizó una sola aplicación al inicio del ciclo de producción, el maíz molido con el inóculo se incorporó en el cajete de los árboles y se procedió a tapar con suelo previamente humedecido (Fig. 4, D). La dosis por árbol fue de 9.2×10^{10} ya que se aplicaron dos bolsas con una concentración de clamidosporas de 4.6×10^{10} cada una usando como vehículo las diferentes enmiendas orgánicas que se evaluaron (Pérez *et al.*, 2010), resultando una dosis de aplicación de 8,372 clamidosporas por gramo de suelo, ya que la concentración mínima efectiva de inóculo es de 5000 clamidosporas por gramo de sustrato (Kerry, 2001; Puertas *et al.*, 2006).

5.11.1. Cálculo de la dosis

Toneladas de suelo·ha⁻¹ = Densidad Aparente (gr/cm³) X Profundidad X 100

Por lo tanto de acuerdo al análisis de suelo y considerando una profundidad de exploración del árbol de 40 cm resulta lo siguiente:

$$(1 \text{ gr/cm}^3)(40 \text{ cm})(100) = 4,000 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}.$$

La densidad de plantación de los huertos de experimentación es de 364 árboles por hectárea. Por lo tanto a cada árbol le corresponde el uso de 10.9 toneladas de suelo que equivalen a $10,989,010.99 \text{ g}^{-1}$, de esa forma tenemos que $9.2 \times 10^{10} / 10,989,010.99 = 8,372$ clamidosporas g^{-1} suelo.

5.11.2. Muestreo de suelos para la extracción de nematodos

Se realizaron cuatro muestreos durante el experimento, el primero antes de la aplicación de los tratamientos para poder conocer la población inicial de los nematodos, el segundo muestreo se llevó acabo 30 días después de la aplicación de los tratamientos, los restantes si hicieron en espacios de 30 días.

En cada árbol se tomaron cuatro submuestras en los cuatro puntos cardinales a una distancia de 40 cm del tronco, posteriormente se homogenizaron en una sola y fueron puestas en hieleras y se trasladaron al laboratorio de

nematología del departamento de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados campos montecillo para hacer la extracción de nematodos.

5.11.2. Extracción de nematodos

Se utilizó el método Tamizado-Centrifugado (Ayoub, 1977; Hooper, 1986) modificado. La muestra de suelo se homogenizó y se tomaron 300 g de suelo los cuales se depositaron en una jarra con dos litros de agua, pasándose de una jarra a otra el suelo se mezcló durante 30 segundos para posteriormente pasar únicamente la parte líquida de la mezcla por el tamiz de 60 mallas y se colectó en una cubeta limpia, ésta mezcla se pasó por el tamiz de 400 mallas para finalmente colectar lo que quedó retenido en éste tamiz. El material colectado se homogenizó y distribuyó de manera equitativa en dos tubos de ensaye de 500 mL para centrifugarlos a 2500 rpm durante 5 min. Una vez que concluyó la centrifugación el sobrenadante de los tubos se decantaron cuidadosamente y se reemplazó por sacarosa al 46 %, en seguida utilizando una varilla de vidrio, el suelo y la sacarosa de los tubos son homogenizados completamente, rápidamente los tubos fueron sometidos nuevamente a centrifugación por 1 min a 1500 rpm. Finalmente el sobrenadante de los tubos se pasaron en un tamiz de 400 mallas y la suspensión se colectó en pequeños frascos de vidrio.

5.11.3. Conteo e identificación de nematodos

La suspensión de nematodos que resulta del tamizado-centrifugado se sustrajo con una jeringa de 25 mL, esto con la finalidad de tener un volumen conocido de la suspensión, después de agitar la jeringa se depositaron 5 mL en tubos de vidrio de 20 mL y se centrifugaron a 5000 rpm por 2 min, al finalizar, con la ayuda de una pipeta de plástico se extrae el sobrenadante dejando una película de agua sobre el concentrado en la parte basal del tubo. El concentrado presente en el fondo del tubo se extrajo con la pipeta y se colocaron alícuotas en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos de 24 x 50 mm. Después se observó en un microscopio compuesto recorriendo todo el campo del cubre objetos

siguiendo un patrón de recorrido para evitar pasar el campo de visión por el mismo lugar.

Éste procedimiento se repitió dos veces para promediar los conteos. Se utilizó un contador para registrar el número de juveniles de *Meloidogyne* sp. y otros géneros de nematodos fitoparásitos.

5.12. Evaluación de rendimiento, diámetro y grados brix de la fruta

El rendimiento de fruto se cuantificó en kilogramos por árbol para cada tratamiento y repetición (Fig. 5, A). Para ello se utilizó una balanza digital con aproximación de 1 g (Maldonado, 2012). Se evaluaron nueve cortes realizados en el ciclo de producción.

El tamaño de la fruta se evaluó tomando diez frutos al azar de cada árbol, con la ayuda de un vernier electrónico para cuantificar el diámetro polar y ecuatorial (Fig. 5, B); las mismas muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Nematología del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados para realizar las mediciones de los grados brix utilizando un refractómetro. Esto se logró moliendo las frutas y depositando gotas de jugo extraído en la celda del instrumento para así tomar las medidas correspondientes (Fig. 5, C, D).



Figura 5. Evaluación de rendimiento, grados brix y diámetro de fruto. A) Colecta de frutos por árbol, B) Medición de diámetro polar y ecuatorial, C) y D) Medición de grado brix.

5.13. Medición del área foliar

El muestreo de hojas se realizó al momento de la floración, se tomaron seis hojas de cada punto cardinal, considerándose hojas del cuarto dosel del ápice de la rama hacia la base (Maldonado, 2012) y a una altura media de cada árbol en las seis repeticiones (Valdivia *et al.*, 2010). Las hojas fueron colocadas en una hielera para poder trasladarlas al Laboratorio de Botánica del Colegio de Postgraduados y posteriormente realizar la medición de área foliar en un Portable Área meter modelo LI-3100.

5.14. Distribución de los tratamientos y análisis estadístico

El diseño se realizó en bloques completos al azar con 8 tratamientos y 6 repeticiones verificando la normalidad y homogeneidad de las varianzas como la humedad del suelo y la pendiente. Los datos obtenidos de las variables medidas se sometieron a un análisis de varianza y cuando en éste se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, se realizó la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Para tal fin se utilizó el programa Statistical Analysis System® para Windows V8.

Cuadro 2. Distribución de tratamientos, Sitio 1. “Cerro colorado”.

BLOQUE 1	T7	T3	T8	T4	T2	T5	T6	T1
BLOQUE 2	T3	T4	T7	T2	T1	T6	T5	T8
BLOQUE 3	T8	T7	T2	T1	T6	T4	T3	T5
BLOQUE 4	T5	T3	T8	T7	T1	T6	T2	T4
BLOQUE 5	T7	T1	T6	T3	T4	T2	T5	T8
BLOQUE 6	T2	T3	T8	T1	T4	T7	T6	T5

T1	Gallinaza
T2	Testigo
T3	Alfalfa molida + <i>P. chlamydosporia</i>
T4	Vermicomposta
T5	Alfalfa molida
T6	Vermicomposta + <i>P. chlamydosporia</i>
T7	<i>P. chlamydosporia</i>
T8	Gallinaza + <i>P. chlamydosporia</i>

Cuadro 3. Distribución de tratamientos. Sitio 2. “La florida”.

BLOQUE 1	T7	T3	T4	T1	T2	T5	T8	T6
BLOQUE 2	T3	T8	T1	T5	T4	T6	T7	T2
BLOQUE 3	T8	T2	T7	T1	T3	T4	T6	T5
BLOQUE 4	T2	T4	T8	T7	T6	T1	T3	T5
BLOQUE 5	T5	T2	T7	T3	T1	T6	T4	T8
BLOQUE 6	T3	T2	T4	T5	T1	T8	T6	T7

T1	Alfalfa molida
T2	Vermicomposta
T3	Gallinaza
T4	Vermicomposta+ <i>P. chlamydosporia</i>
T5	Testigo
T6	<i>P. chlamydosporia</i>
T7	Gallinaza + <i>P. chlamydosporia</i>
T8	Alfalfa molida + <i>P. chlamydosporia</i>

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identificación de la especie de *Meloidogyne*

Las características morfológicas de juveniles, hembras y patrones perineales de las hembras de *Meloidogyne*, permitieron identificar a la especie *M. arenaria* presente en los dos sitios de experimentación.

Las hembras presentan un cuerpo globoso (Fig. 6, F) y en los patrones perineales se observó la presencia de un arco dorsal bajo y redondeado, las estrías en el arco se curvan ligeramente hacia las líneas laterales formando la ondulación conocida como hombreras, estrías cortas e irregulares marcaron los campos laterales (Eisenback *et al.*, 1985) (Fig. 6, D, E). El estilete de las hembras es amplio y robusto, con los nódulos proyectados hacia atrás y se funden gradualmente en la base, la longitud del estilete promedio es de 15.5 μm . Los juveniles (J2) de *M. arenaria*, son vermiformes, de cuerpo delgado presentando una sobre posición ventral y una porción hialina en la parte terminal de la cola (Fig.6, A, C). La cabeza presenta la parte frontal redondeada, el disco labial y los labios medios se funcionan para formar una estructura lisa, continua, y alargada. La región cefálica es generalmente lisa pero puede estar marcada por uno o tres anillos incompletos, Se registró un promedio de la longitud de los nódulos a la base del estilete de 3.5 μm . (Fig.6, B).

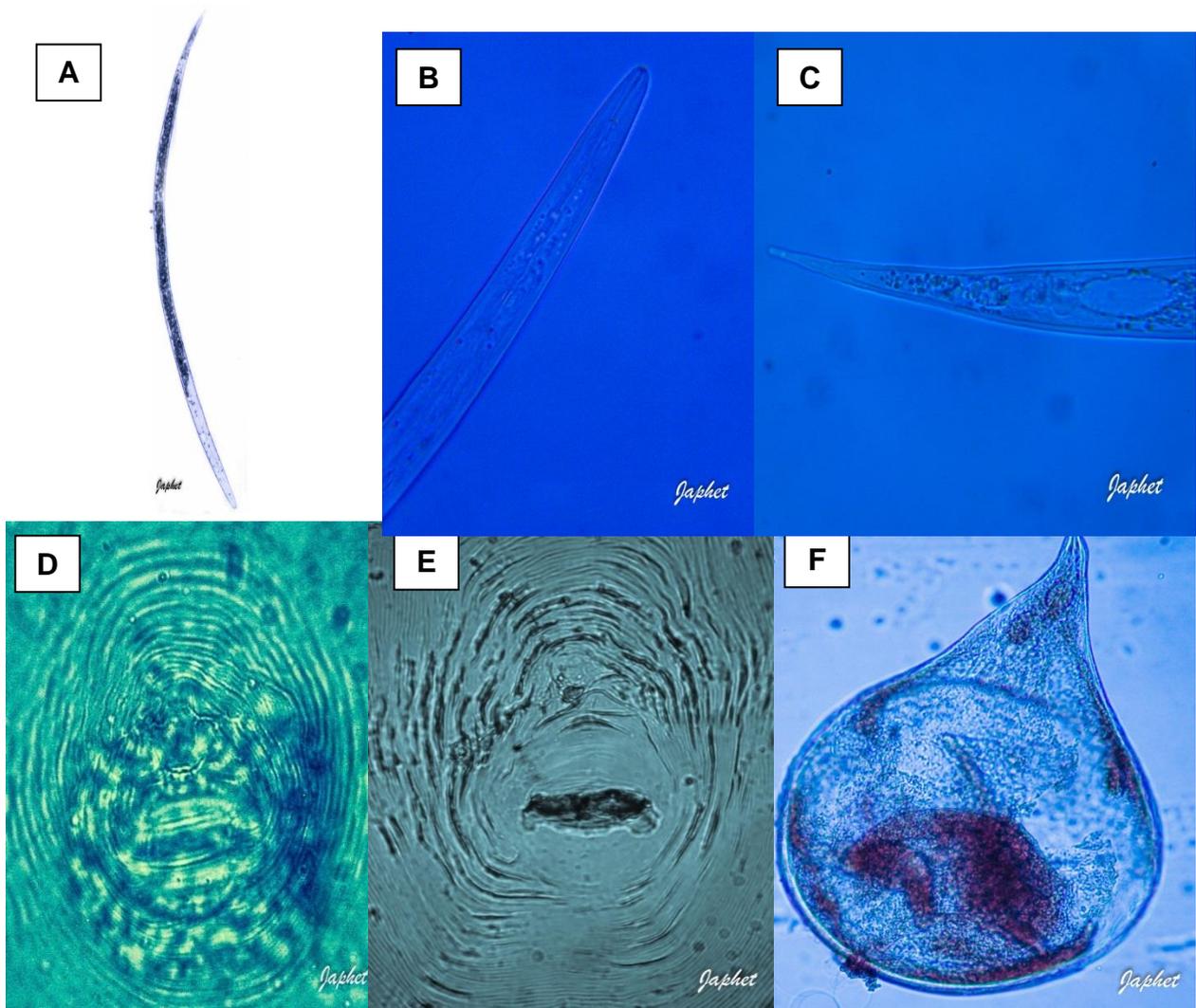


Fig. 6. Características morfológicas de *Meloidogyne arenaria*.

A) Juvenil J2. B) Parte anterior del cuerpo de J2. C) Porción hialina de la cola. D,E) Patrón perineal de *M. arenaria*. F) Hembra de *M. arenaria*.

6.2. Aislamiento de *P. chlamydosporia*

Se obtuvieron dos aislamientos nativos del lugar de estudio, una proveniente de la raíz y la segunda del suelo (Fig. 7, A, B).

En el medio semiselectivo después de 10 días de incubación se observaron pequeñas colonias color blanco (Fig. 7, C) que bajo el microscopio se apreciaron estructuras como conidios solitarios dispuestos en fialides, además un micelio verticilado.

En medio PDA (Papa - Dextrosa - Agar) *P. chlamydosporia* tiene un crecimiento esponjoso de color blanco que con el tiempo adquieren una tonalidad marrón o crema, en el reverso de la colonia puede llegar a adquirir una tonalidad amarilla (Gams, 1988; Kerry and Bourne, 2002).

6.3. Caracterización morfológica de *P. chlamydosporia* var. *Chlamydosporia*

En las preparaciones del hongo con 15 días de crecimiento en medio PDA se observó una abundante cantidad de dictioclamidosporas (Fig. 7, F) de 20 a 25 μm de diámetro con paredes gruesas, pecioladas en un micelio aéreo. El micelio es delgado, con fialides dispuestas por separado (Fig. 7, D, E) o en verticilos de dos a tres hifas postradas. Las conidias son ovoides o elipsoidales con paredes delgadas y lisas, no están dispuestas en cadena sino en conidióforos simples, lo que nos indicó que se trata de la variedad *chlamydosporia*, (Fig. 7, D, E) (Gams, 1988; Kerry and Bourne, 2010).

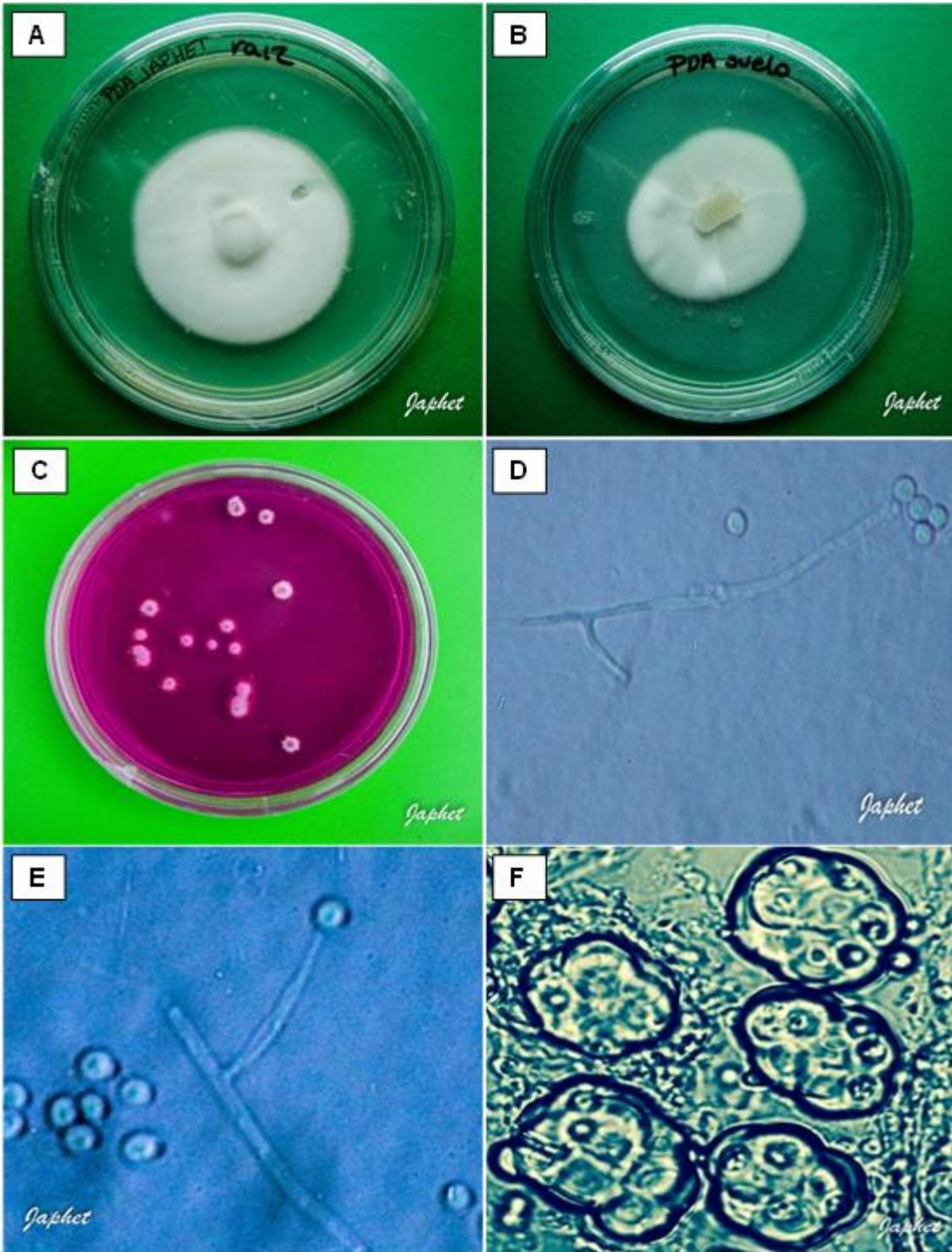


Figura 7. Morfología de *P. chlamydosporia*. **A)** Aislamiento *P. chlamydosporia* "Raíz" **B)** Aislamiento *P. chlamydosporia* "Suelo." **C)** Colonias de *P. chlamydosporia* en medio semiselectivo. **D)** Micelio verticilado y conidios. **E)** Conidio en fialide solitaria. **F)** Dictioclamydosporas.

6.4. Identificación molecular de *Pochonia chlamydosporia*

La secuencia analizada como aislamiento del hongo *Pochonia chlamydosporia* cuyo contenido de pares de bases es de 618 bp tuvo una alta homología a las contenidas dentro del GenBank. Los resultados del BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information) indican que hubo una identidad del 99 % con *Pochonia chlamydosporia* **AY912487.1** (Cuadro 2).

> *Pochonia chlamydosporia* (Sin. *Verticillium chlamydosporium*) de 618 bp

```
AATGGGGCATTCTACCTGATTGAGGTCCTTAAAAAAAAGTTGGGCGTT
TTACGGCAGTGGCCGCGCCGCGCTCCTGATGCGAGGTTGTGCTACTACGCA
GAGGAGGCCGCGACGAGACCGCCAATTCATTTTCGGGGGCGGCCGAGGG
AAGGGGGACAAGTCCCCAAAGCCTCTGTACTCGCCGGTCCCCAACACCAAAC
CGCTGGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAA
TACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCA
ATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGA
GATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTGTAAATGATTCCACTCAGACATGCT
AAAATAAAAATCTAGAGTTTGGGTCCCCCGCGGGCCGCCTGGTTCCGGGGT
GTAAAGCCCGGGGCGAGAACCCGCGAAGCAACGGTTGTAAATGGTATAAGT
TCACATGGGGTTTGGGAGTTGAAAACCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCA
CCAACGGAGACCTTGTTACATTTTTTCTTCCAAAACATGGCG
```

Cuadro 4. Datos arrojados por el BLAST del GenBank, para la secuencia de *Pochonia chlamydosporia*.

Sequences producing significant alignments:						
Select: All None Selected:0						
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Cordyceps chlamydosporia genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	1068	1068	97%	0.0	99%	AB100362.1
<input type="checkbox"/> Verticillium chlamydosporium 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene (partial), isolate Vc 10	1068	1068	97%	0.0	99%	AJ291800.1
<input type="checkbox"/> Verticillium chlamydosporium , 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene (partial), isolate INEM 021 >emb AJ291806.1 Verticillium c	1068	1068	97%	0.0	99%	AJ291801.1
<input type="checkbox"/> Metacordyceps chlamydosporia genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	1062	1062	97%	0.0	99%	AB214654.1
<input type="checkbox"/> Verticillium chlamydosporium 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene (partial), isolate RES 30	1062	1062	97%	0.0	99%	AJ291802.1
<input type="checkbox"/> Verticillium chlamydosporium 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene (partial), isolate RES 80	1062	1062	97%	0.0	99%	AJ291803.1
<input type="checkbox"/> Metacordyceps chlamydosporia strain UCR 4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	1061	1061	95%	0.0	99%	JQ433954.1
<input type="checkbox"/> Pochonia chlamydosporia isolate Pc 472 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	1061	1061	96%	0.0	99%	AY912487.1

Según lo observado en laboratorio y de acuerdo a lo reportado por Kerry y Bourne, (2002) las colonias descritas morfológicamente coinciden con la

secuenciación molecular del hongo *Pochonia chlamydosporia* en medio de cultivo PDA produce característicos conidióforos en pareja y un micelio verticilado (Gamms, 1988). El hongo produce clamidosporas solo cuando es transferido a medio Papa-Agar.

6.5. Reproducción masiva de *P.chlamydosporia*

Las bolsas con maíz inoculadas con el hongo después de 21 días de incubación a una temperatura constante de 27°C se observó completa colonización del sustrato por *P. chlamydosporia*, se cuantificó una concentración total de 4.6×10^{10} clamidosporas en 250g de maíz quebrado.



Figura 8. A) Maíz molido Inoculado B) Maíz colonizado por *P. chlamydosporia* de 21 días de crecimiento

6.5.1 Parasitismo de huevos

El aislamiento proveniente de raíz parasitó el 89 % de los huevos de los 300 previamente desinfectados que se depositaron en las cajas Petri con crecimiento de *P. chlamydosporia* (Fig. 9), el aislamiento que se obtuvo del suelo parasitó el 83%.

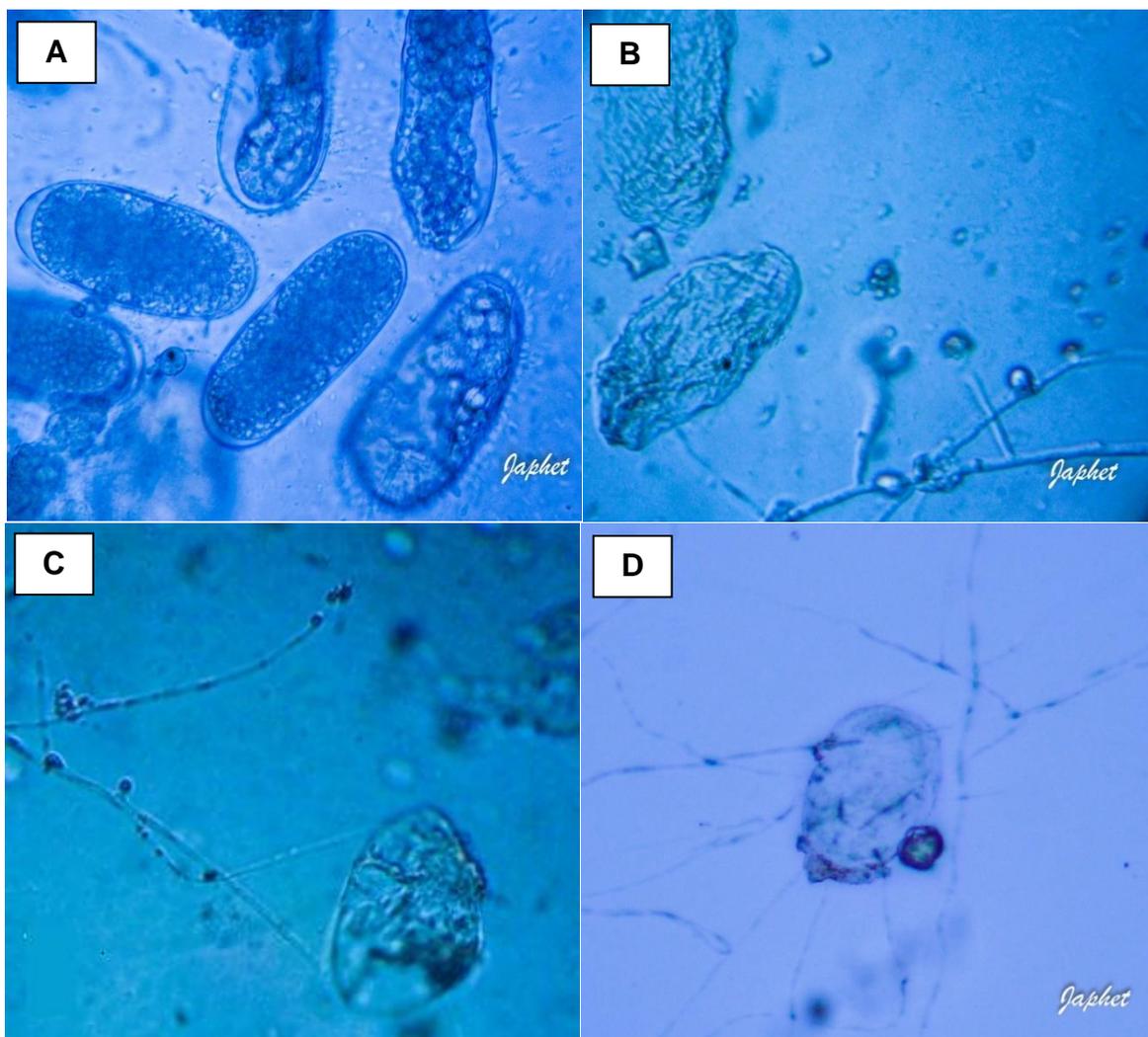


Figura 9. Prueba de parasitismo de huevos. **A)** Huevos de *M. arenaria*. **B, C, D)** Huevos de *M. arenaria* parasitados por *Pochonia chlamydosporia*.

Cálculo de cantidades de abonos orgánicos utilizados.

Gallinaza:

$$120/0.80 = 150 \text{ kg de N orgánico}\cdot\text{ha}^{-1}.$$

$$150/0.037 = 4,054 \text{ kg de abono orgánico seco}\cdot\text{ha}^{-1}.$$

$$4.054/0.82 = 4,943.9 \text{ kg de abono orgánico húmedo}\cdot\text{ha}^{-1}.$$

$$4,943.9/364 \text{ árboles} = \underline{13.5 \text{ kg de Gallinaza por cada árbol.}}$$

Vermicomposta:

$$120/0.40 = 300 \text{ kg de N orgánico}\cdot\text{ha}^{-1}.$$

$$300/0.025 = 12000 \text{ kg de abono orgánico seco}\cdot\text{ha}^{-1}.$$

$$12000/0.78 = 15,384 \text{ kg de abono orgánico húmedo}\cdot\text{ha}^{-1}.$$

$$15,384/364 \text{ árboles} = \underline{42.2 \text{ kg de vermicomposta por cada árbol.}}$$

Alfalfa:

$$120/ .60 = 200 \text{ kg de N orgánico}\cdot\text{ha}^{-1}.$$

$$200/.03= 6,666.66 \text{ Kg de abono orgánico seco}\cdot\text{ha}^{-1}.$$

$$6,666.66/.84= 7,936.5 \text{ kg de abono orgánico húmedo}\cdot\text{ha}^{-1}.$$

$$7,936.5/364 \text{ árboles}= \underline{21.80 \text{ kg de Alfalfa molida por cada árbol.}}$$

Cuadro 5. Efecto de los abonos orgánicos y *P.chlamydosporia* sobre el guayabo y el nematodo agallador en el sitio 1. Cerro colorado.

Tratamiento	N° de J2/ 300g Inicial	N° de J2/ 300g Final	Rendimiento (Kg)	Área foliar (cm ²)	Grados brix	Díametro de fruto (mm)
T1.Gallinaza	690	450	233 BA	622 A	11.7 A	48 A
T2.Testigo	200	200	112 C	636 A	11.3 BA	41 BA
T3.Alfalfa molida + <i>P. chlamydosporia</i>	584	115	222 BA	672 A	11.4 BA	46 BA
T4.Vermicomposta	502	55	166 BC	643 A	10.3 BA	44 B
T5.Alfalfa molida	490	70	167 BC	608 A	10 B	43 B
T6.Vermicomposta + <i>P. chlamydosporia</i>	571	21	136 BC	660 A	10.4 B	46 BA
T7. <i>P. chlamydosporia</i>	456	293	160 BC	618 A	11.2 BA	45 BA
T8.Gallinaza + <i>P. chlamydosporia</i>	602	132	244 A	646 A	11.1 BA	44 BA
Modelo	-	-	12	12	9	12
Error	-	-	35	35	14	35
Total	-	-	47	47	23	47
R ²	-	-	0.588	0.380	0.438	0.272
CV	-	-	35.62	8.66	6.448	22.45

Letras iguales = No existen diferencias significativas entre tratamientos, C.V. = Coeficiente de variación

Cuadro 6. Efecto de los abonos orgánicos y *P.chlamydosporia* sobre el guayabo y el nematodo agallador en el sitio 2. La florida.

Tratamiento	N° de J2/ 300g Inicial	N° de J2/ 300g Final	Rendimiento (Kg)	Área foliar (cm ²)	Grados brix	Díametro de fruto(mm)
T1. Alfalfa molida	400	229	229 A	585.2 BA	13.2 A	52 BA
T2. Vermicomposta	220	90	163 A	663.9 B	12.2 A	52 BA
T3. Gallinaza	405	100	197 A	624.2 BA	13.2 A	52 B
T4. Vermicomposta+ <i>P. chlamydosporia</i>	750	40	196 A	643.8 BA	13.4 A	53 A
T5. Testigo	134	250	180 A	619.8 BA	12.7 A	49 B
T6. <i>P. chlamydosporia</i>	312	91	191 A	610.5 BA	13.0 A	51 BA
T7.Gallinaza + <i>P. chlamydosporia</i>	342	81	200 A	666.1 A	12.5 A	53 A
T8. Alfalfa molida + <i>P. chlamydosporia</i>	512	113	229 A	652.3 A	13.0 A	51 A
Modelo	-	-	12	12	9	12
Error	-	-	35	35	14	35
Total	-	-	47	47	23	47
R ²	-	-	0.090	0.192	0.491	0.451
CV	-	-	48.118	28.569	6.228	50.254

Letras iguales = No existen diferencias significativas entre tratamientos, C.V. = Coeficiente de variación

6.6. SITIO 1. CERRO COLORADO

6.6.1 Evaluación inicial de la fauna nematológica

A continuación en la figura 10 se presenta el resultado de la primera evaluación de la fauna nematológica antes de aplicar los diferentes tratamientos correspondientes. Donde se puede apreciar mayor presencia de nematodos fitopatógenos, la población de *Meloidogyne arenaria* juvenil (J2) es más abundante respecto a las demás con 400 nematodos vermiformes, seguido por el género *Helicotylenchus* sp. con 89, después *Mesocriconema* sp. con 47, *Pratylenchus* sp. se encontraron 38 nematodos y 9 *Tylenchorhynchus* sp. También se detectaron nematodos de vida libre del orden Dorilaimida, Rhabditida, Diplogasterida y del género *Tylenchus* y *Psilenchus* en menor proporción.

En el último muestreo fue evidente la reducción de la población de los nematodos fitopatógenos y el incremento de los nematodos de vida libre, se encontraron 356 *Tylenchus* sp., 143 *Psilenchus* sp., 93 *Butlerius* sp. (Diplogasterida), 41 nematodos del orden Dorilaimida y 87 de Rhabditida.

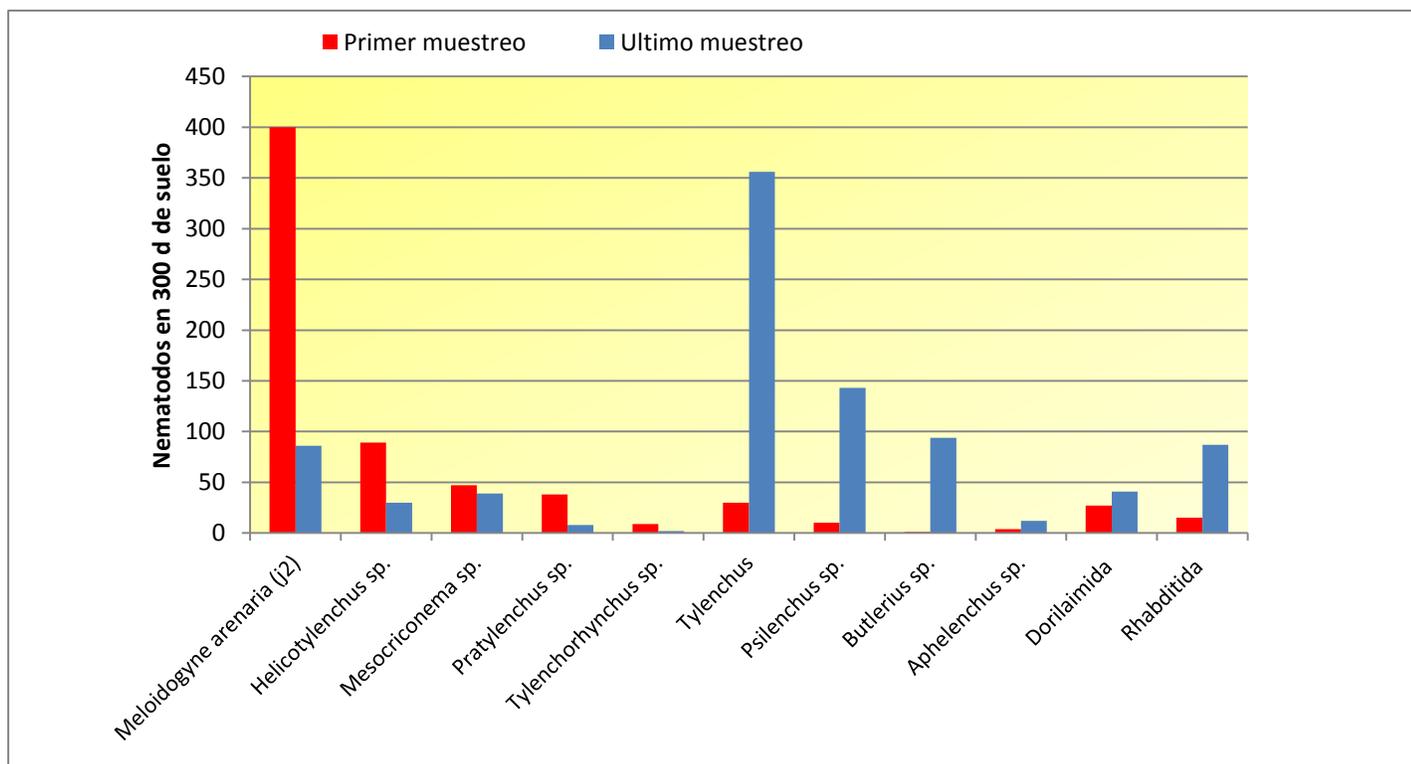


Figura 10. Población inicial de nematodos en el sitio1 cerro colorado en 300 g de suelo.

6.6.2. Evaluación de población de *Meloidogyne arenaria* juvenil (J2) por tratamiento en cada muestreo

En la figura 11 Se muestra el efecto de los tratamientos en los muestreos que se realizaron a partir de la aplicación del hongo y los abonos orgánicos, se presentaron diferencias en el efecto de los diferentes tratamientos, cabe resaltar que la población de inicial de cada tratamiento fue diferente, un ejemplo es el tratamiento con gallinaza (G) donde en el segundo muestreo se registró una población promedio de 600 juveniles (J2) de *M. arenaria* y en el tercero se redujo a 560 juveniles (J2) y en el último muestreo a 450 juveniles (J2) en 300 g de suelo, en cambio en el mejor tratamiento que fue vermicomposta más *P.chlamydosporia* la población del segundo muestreo fue de 517 juveniles (J2) y en el cuarto muestreo se redujo a 21, representado una reducción de nematodos agalladores del 96%. Es notable que cuando se aplicó únicamente *P.chlamydosporia* (P) la población de *M. arenaria* juvenil (J2) no se vio reducida, incluso de 448 nematodos encontrados en el segundo muestreo, en el siguiente se contaron 455 nematodos vermiformes.

En los árboles testigo la población inicial fue relativamente baja, sin embargo ésta se vio incrementada con el paso del tiempo ya que en el segundo muestreo se registró una población de 120 juveniles (J2) y en el último muestreo la población resultó de 200 nematodos en los 300g de suelo que se utilizaron.

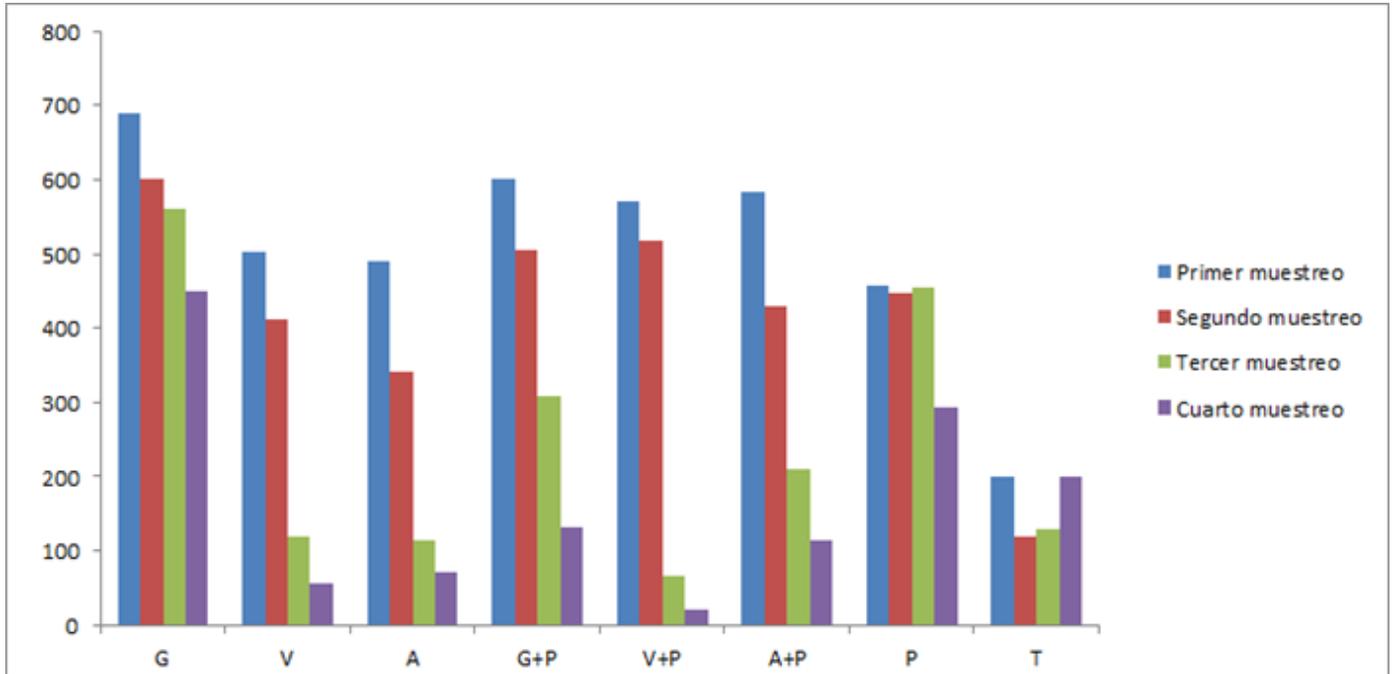


Figura 11. Efecto de los tratamientos en la población de juveniles (J2) de *M. arenaria* G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más *P.chlamydosporia*, V+P= Vermicomposta más *P. chlamydosporia*, A+P= Alfalfa molida más *P.chlamydosporia*, P= *P. chlamydosporia*, T= Testigo.

6.6.3. Efecto de los tratamientos en la producción de fruta

En la figura 12 se observa que estadísticamente no existió diferencias significativas en el rendimiento en los tratamientos de Gallinaza (G), Vermicomposta (V), Alfalfa molida (A), Vermicomposta más *P.chlamydosporia* (V+P), Alfalfa molida más *P. chlamydosporia* (A+P) y *Pochonia chlamydosporia* (P). Únicamente en el tratamiento Gallinaza más *P, chlamydosporia* (G+P) y el testigo (T) fue donde se presentó diferencias significativas respecto a los demás. En el tratamiento de G+P se obtuvo el mayor rendimiento con 244 kg de fruta en seis árboles donde se aplicó el tratamiento.

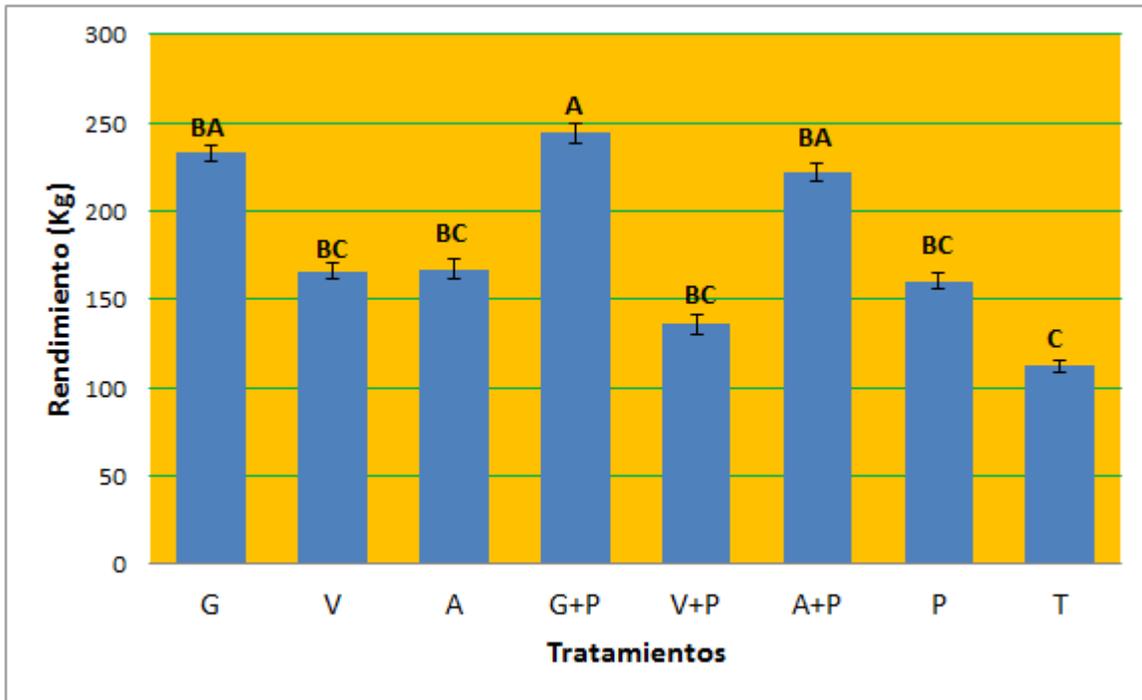


Figura 12. Efecto de los tratamientos en el rendimiento de producción. G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más *P.chlamydosporia*, V+P= Vermicomposta más *P. chlamydosporia*, A+P= Alfalfa molida más *P.chlamydosporia*, P= *P. chlamydosporia*, T= Testigo.

6.6.4. Efecto de los tratamientos en el área foliar

En la figura 13 Se muestra que no existió diferencia significativa entre tratamientos y su efecto en el área foliar de los árboles aun que en el tratamiento de alfalfa molida más *P.chlamydosporia* se obtuvo la mayor área foliar (672cm²) y el valor más bajo resultó en el tratamiento con Alfalfa molida (A) con 608 cm².

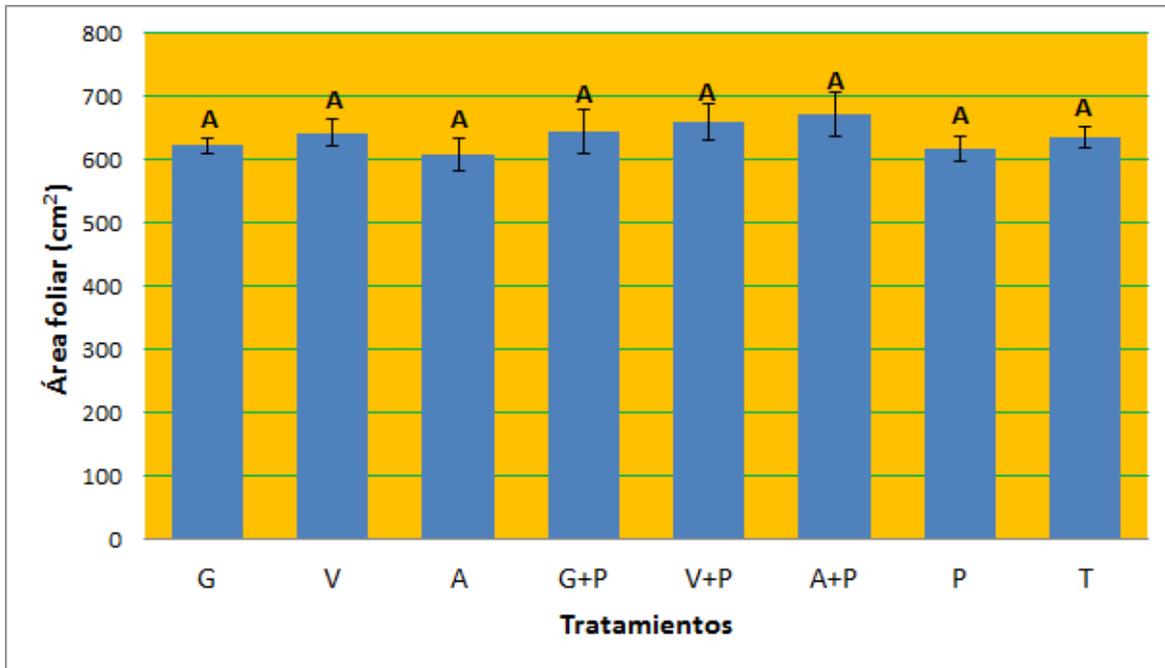


Figura 13. Efecto de los tratamientos en el área foliar de los árboles. G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más *P.chlamydosporia*, V+P= Vermicomposta más *P. chlamydosporia*, A+P= Alfalfa molida más *P.chlamydosporia*, P= *P. chlamydosporia*, T= Testigo.

6.6.5. Efecto de los tratamientos en la concentración de los grados brix

A continuación en la figura 14 están graficados los datos que se obtuvieron en la estimación de los grado brix de frutos de los diferentes tratamientos en los cuales no existió diferencia significativa entre los diferentes tratamientos que se aplicaron.

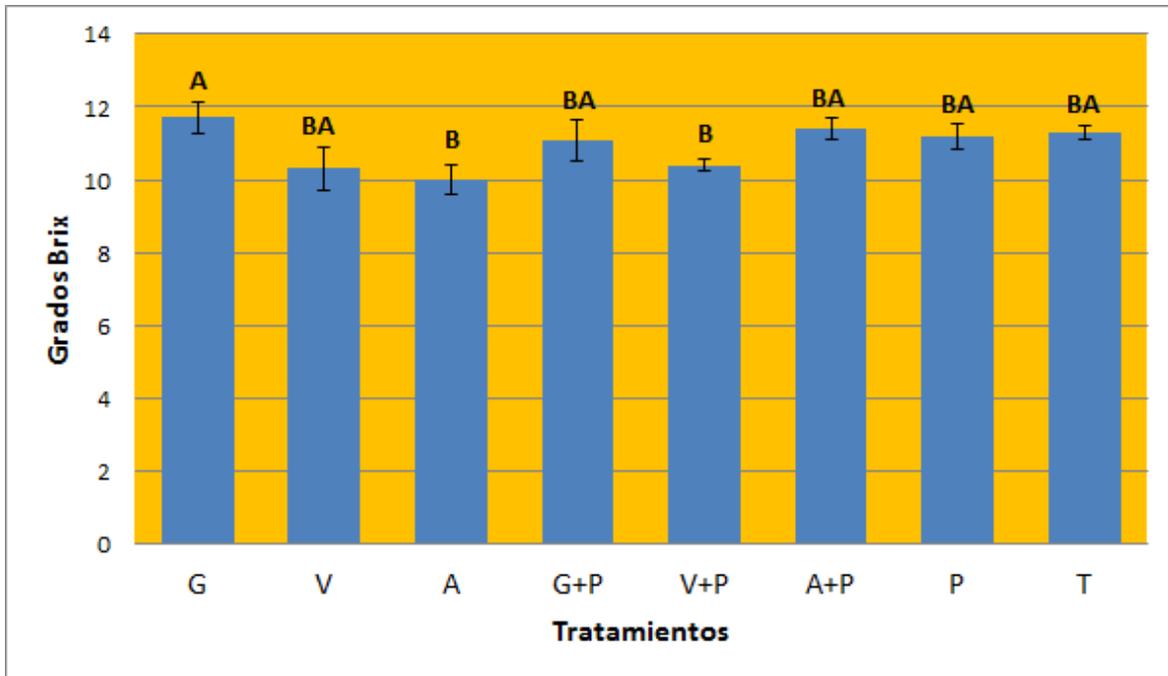


Figura 14. Efecto de los tratamientos en la concentración de los grados brix. G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más *P.chlamydosporia*, V+P= Vermicomposta más *P. chlamydosporia*, A+P= Alfalfa molida más *P.chlamydosporia*, P= *P. chlamydosporia*, T= Testigo.

6.5.6. Efecto de los tratamientos en el tamaño de la fruta

No hubo diferencia significativa entre tratamientos (Figura 15), pero el valor más alto en el promedio del diámetro polar y ecuatorial se obtuvo en el tratamiento de gallinaza (G) con 48 mm y el valor más bajo se estimó en el tratamiento testigo (T) con 41 mm.

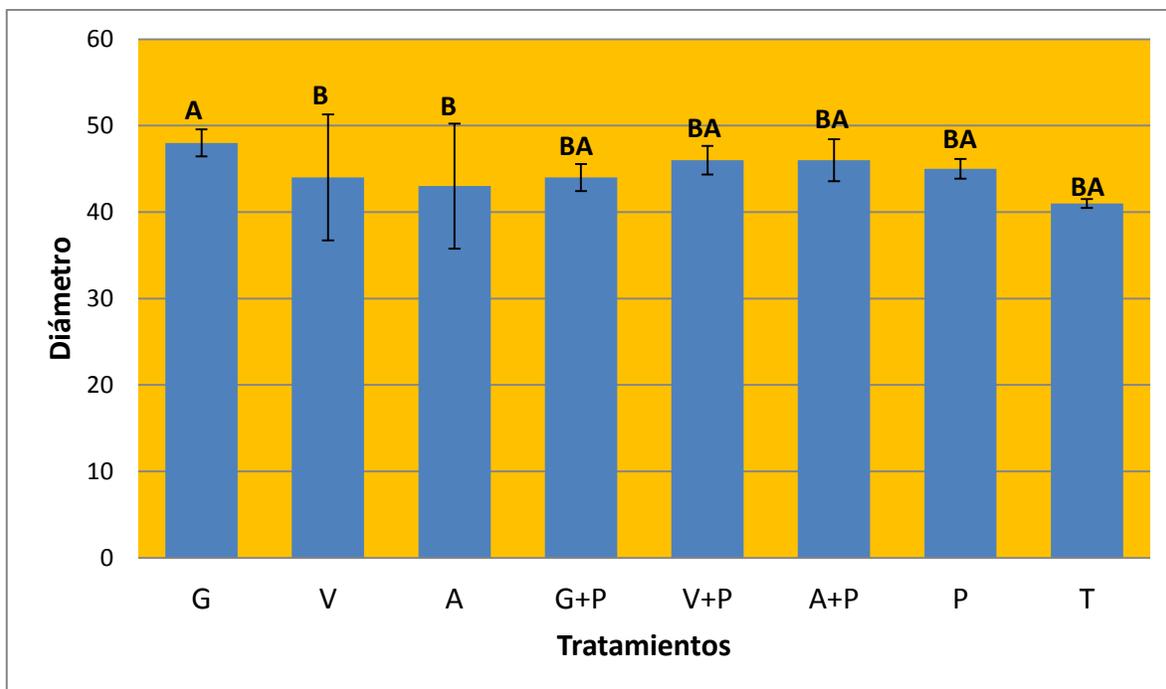


Figura 15. Efecto de los tratamientos en el tamaño de la fruta. G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más *P.chlamydosporia*, V+P= Vermicomposta más *P. chlamydosporia*, A+P= Alfalfa molida más *P.chlamydosporia*, P= *P. chlamydosporia*, T= Testigo.

6.7. SITIO 2. LA FLORIDA

Evaluación inicial de la fauna nematológica

En la figura 16 se presenta el resultado de la primera evaluación de la fauna nematológica antes de aplicar los diferentes tratamientos correspondientes. Donde se puede apreciar mayor presencia de nematodos fitopatógenos, la población de *Meloidogyne arenaria* juvenil (J2) es más abundante respecto a las demás con 345 nematodos vermiformes, seguido por el género *Mesocriconema* sp. con 58, después *Pratylenchus* sp. con 36, 140 *Helicotylenchus* sp. y 9 *Tylenchorhynchus* sp. Del género *Tylenchus* sp. y *Psilenchus* sp. se detectaron 81 y 34 nematodos en 300 g de suelo respectivamente. Estuvieron presentes en menor proporción nematodos del orden Dorilaimida, Rhabditida, Monochida y Desmoscolecida, en el último muestreo éstos nematodos aumentaron su población y los nematodos fitoparásitos se redujeron. Se encontraron 8 *Milonchulus* sp., 15 *Prismatolaimus*

sp., 54 *Desmoscolex* sp., 33 nematodos del orden Dorilaimida y 261 de Rhabditida.

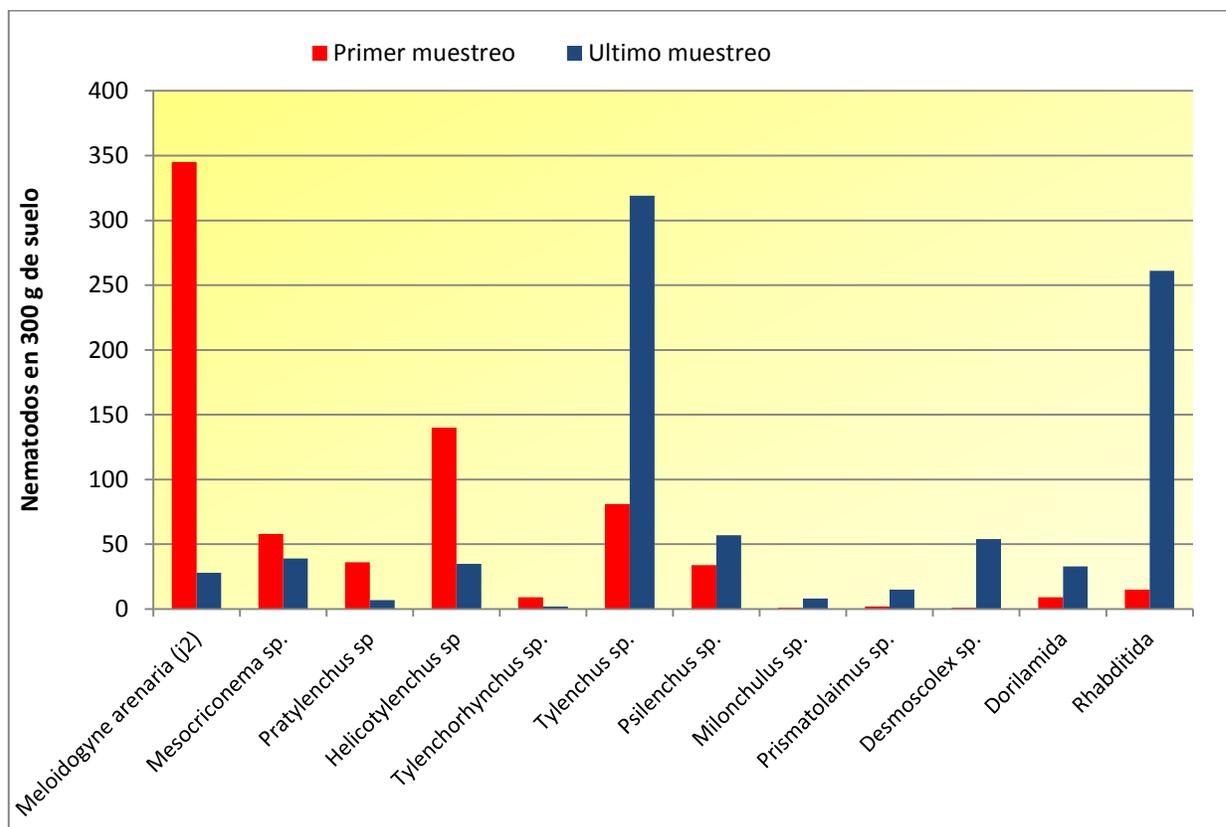


Figura 16. Población inicial de nematodos en el sitio 2 la florida en 300 g de suelo.

6.6.2. Evaluación de población de *Meloidogyne arenaria* juvenil (J2) por tratamiento en cada muestreo

A continuación (Figura 17) se muestra que el mejor tratamiento resultó el uso de la vermicomposta más *P. chlamydosporia* (V+P) ya que redujo la población inicial de 750 juveniles (J2) de *Meloidogyne arenaria* a 40 en el último muestreo resultando una reducción de la población de juveniles (J2) de los nematodos agalladores en un 95%. Gallinaza más *P. chlamydosporia* (G+P) redujo de 342 juveniles (J2) a 97 nematodos en el último muestreo, siendo así una reducción del 71% de la población total de juveniles de *M. arenaria*. En el tratamiento testigo (T) la población de juveniles de los nematodos agalladores se incrementó de 134 a 250 nematodos en 300 g de suelo.

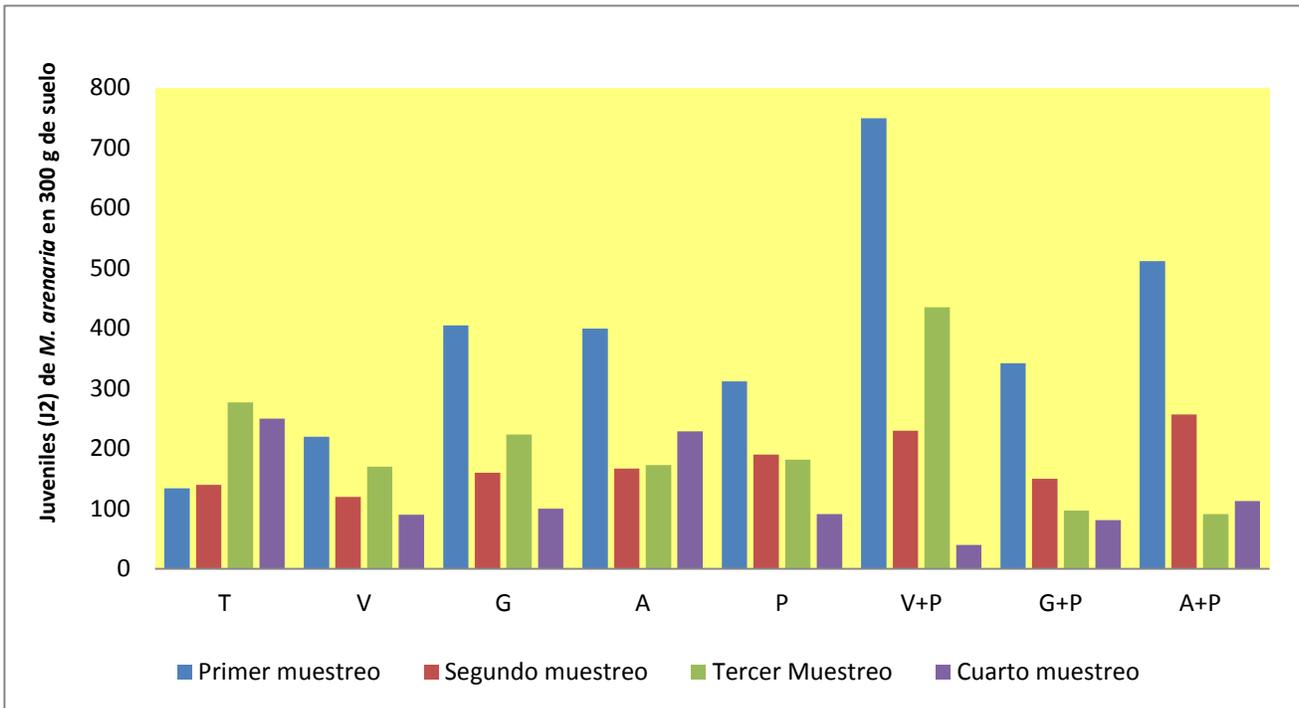


Figura 17. Efecto de los tratamientos en la población de juveniles (J2) de *M. arenaria*
 G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más *P.chlamydosporia*, V+P= Vermicomposta más *P. chlamydosporia*, A+P= Alfalfa molida más *P.chlamydosporia*, P= *P. chlamydosporia*, T= Testigo.

6.6.3. Efecto de los tratamientos en la producción de fruta

En la figura 18 se muestra que estadísticamente no hubo diferencias significativas entre tratamientos en la producción, aunque los valores más altos de producción se obtuvieron en el tratamiento donde se utilizó únicamente alfalfa molida con 229 Kg en ocho árboles, que considerando una plantación de 364 árboles por hectárea representa un rendimiento de 10.5 t·ha.

El valor más bajo de producción se registró en los árboles con el tratamiento abono verde más *P. chlamydosporia* donde los ocho árboles produjeron 168 Kg de fruta.

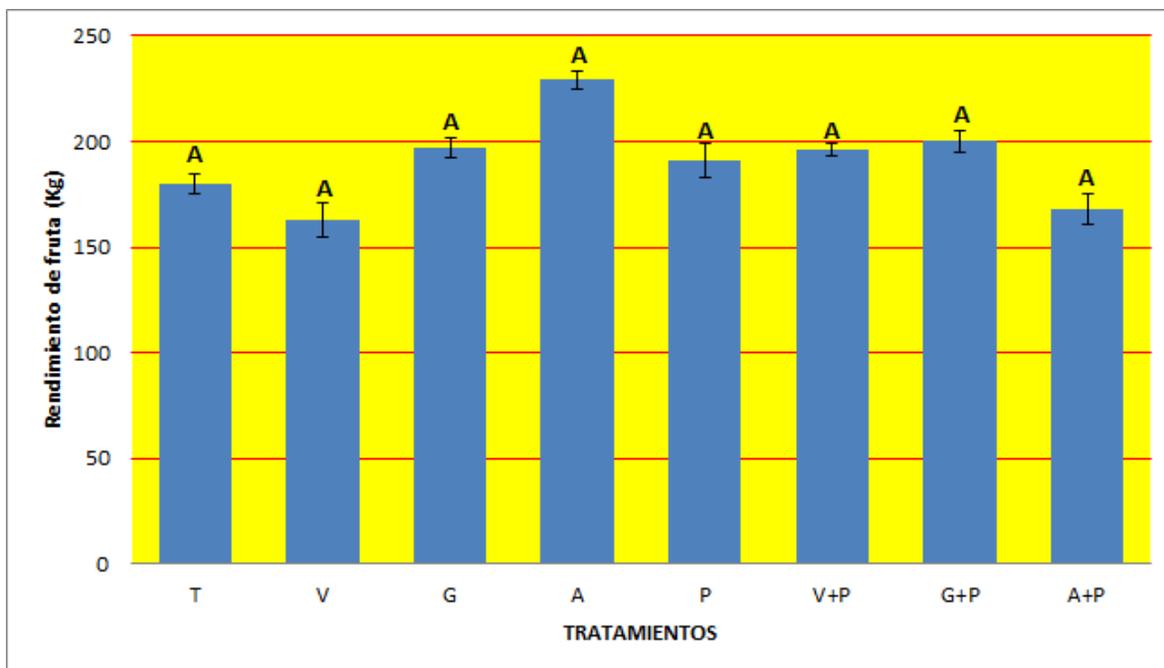


Figura 18. Efecto de los tratamientos en la de producción de fruta.
 G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más *P.chlamydosporia*, V+P= Vermicomposta más *P. chlamydosporia*, A+P= Alfalfa molida más *P.chlamydosporia*, P= *P. chlamydosporia*, T= Testigo.

6.6.4. Efecto de los tratamientos en el área foliar

A continuación en la figura 19 están graficados los resultados de la medición del área foliar y se muestra que existieron diferencias significativas en los tratamientos de alfalfa más *P. chlamydosporia* (A+P), gallinaza más *P.chlamydosporia* (G+P) y Vermicomposta (V) respecto a los demás. El valor más alto del promedio de la medición de 24 hojas se obtuvo en el tratamiento de G+P con 666.1 cm² y el valor más bajo en el tratamiento de alfalfa (585.2cm²).

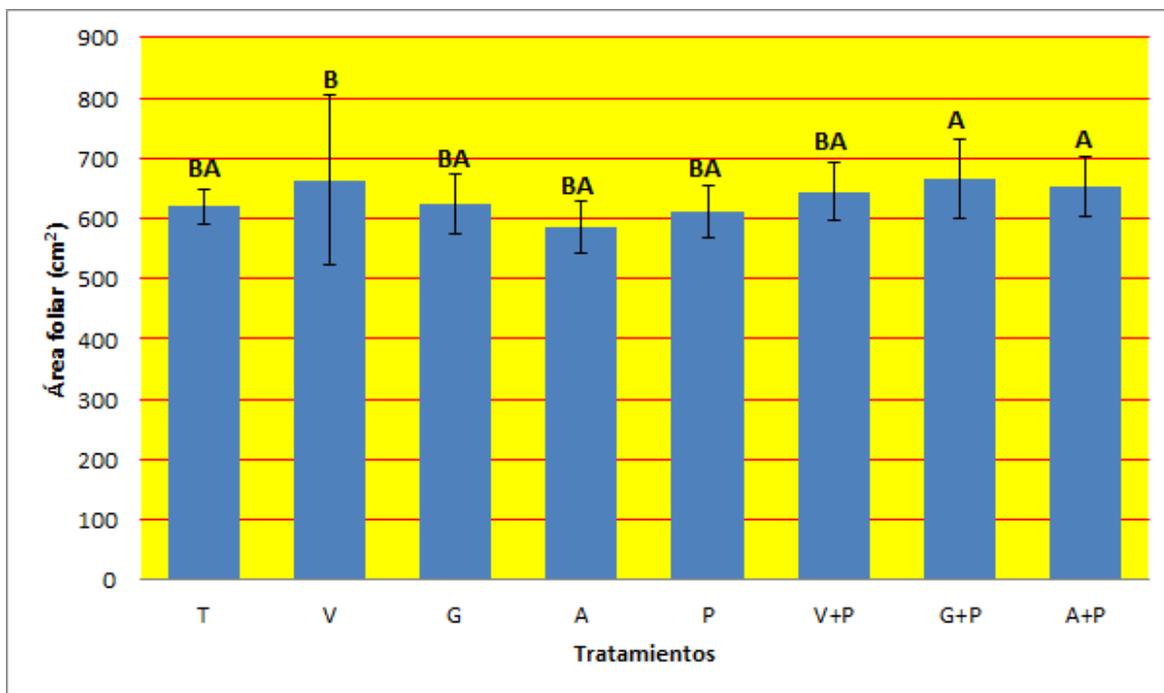


Figura 19. Efecto de los tratamientos en el área foliar de los árboles.
 G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más *P.chlamydosporia*, V+P= Vermicomposta más *P. chlamydosporia*, A+P= Alfalfa molida más *P.chlamydosporia*, P= *P. chlamydosporia*, T= Testigo.

6.6.4. Efecto de los tratamientos en la concentración de grados brix

La figura 20 muestra que no existieron diferencias significativas en los diferentes tratamientos en la concentración de grados brix, pero es evidente que en el tratamiento de Vermicomposta más *P.chlamydosporia* se presentó una mayor concentración con 13.4.

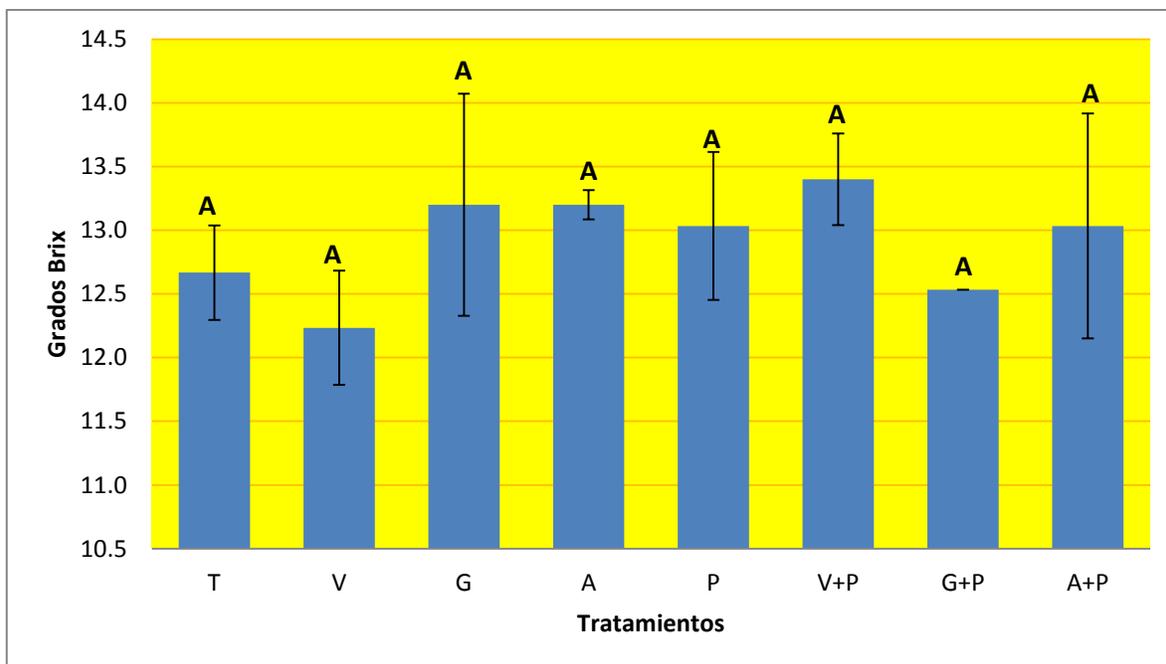


Figura 20. Efecto de los tratamientos en la concentración de los grados brix.
 G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más *P.chlamydosporia*, V+P= Vermicomposta más *P. chlamydosporia*, A+P= Alfalfa molida más *P.chlamydosporia*, P= *P. chlamydosporia*, T= Testigo.

6.6.5. Efecto de los tratamientos en el tamaño de la fruta

En la siguiente gráfica (Figura 21) se muestra que existió diferencias significativa del tamaño de la fruta entre los tratamientos de gallinaza más *P.chlamydosporia* (G+P) y alfalfa más *P.chlamydosporia* (A+P) respecto a los tratamientos de testigo (T) y gallinaza (G). En los demás tratamientos no se presentaron diferencias significativas.

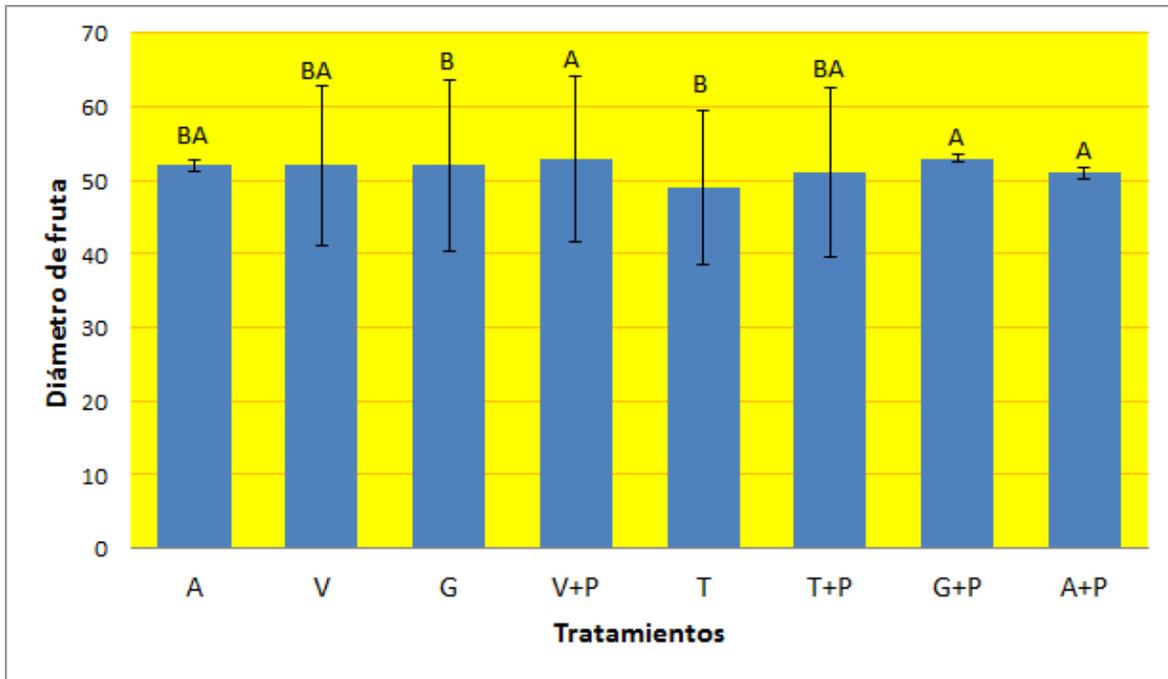


Figura 21. Efecto de los tratamientos en el tamaño de la fruta.
 G= Gallinaza, V= Vermicomposta, A= Alfalfa molida, G+P= Gallinaza más *P.chlamydosporia*, V+P= Vermicomposta más *P. chlamydosporia*, A+P= Alfalfa molida más *P.chlamydosporia*, P= *P. chlamydosporia*, T= Testigo.

6.7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La morfología de los patrones perineales coincidieron con lo descrito por Eisenback *et al.*, (1985) y permitieron diagnosticar la presencia de *Meloidogyne arenaria* en las plantaciones de guayabo en la región del oriente de Michoacán, coincidiendo con lo encontrado por Avelar *et al.*, (2001) quienes mencionan a *Meloidogyne incognita*, *M.javanica* y *M. arenaria* asociadas al cultivo de guayabo en Calvillo, Aguascalientes. Es posible que exista la presencia de otras especies de *Meloidogyne* asociadas al guayabo en la región lo que podría corroborarse realizando un muestreo más amplio del área de producción.

Arevalo *et al.*, (2009) lograron obtener aislamientos de *Pochonia chlamydosporia* de plantaciones de guayaba con problemas con *Meloidogyne mayaguensis*, de ésta manera nuestra búsqueda de *P. chlamydosporia* en el área de estudio también resultó exitosa ya que fue posible obtener dos aislamientos, uno proveniente de raíz y otra de suelo, lo que demuestra que éste hongo se encuentra de manera natural como supresor en éstos suelos infestados con nematodos agalladores como lo mencionan López – Llorca *et al.*, (2002); Manzanilla *et al.*, (2013). De acuerdo a las pruebas sobre su potencial parasítico, se encontró que ambos aislamientos tienen el potencial para ser utilizados como agente de control biológico, ya que en pruebas invitro mostraron capacidad de parasitar huevos de *M. arenaria* por arriba del 80% y 18×10^7 de clamidosporas por gramo de sustrato colonizado, éstos resultados son similares a los obtenidos por Pérez *et al.*, (2010); Hidalgo *et al.*, (2000) Franco *et al.*, (2012). De esta manera los aislamientos obtenidos en ésta investigación tienen el potencial para ser utilizados como organismos de control biológico de nematodos agalladores en futuras investigaciones, es importante estandarizar el método de reproducción masiva de dicho hongo ya que se comporta de manera diferente según el sustrato en que se reproduce.

La incorporación de los diferentes materiales orgánicos al suelo tuvo impacto en la reducción la población de juveniles (J2) de *Meloidogyne arenaria*. Se conoce que algunos sustratos vegetales al ser incorporados al suelo crean un efecto positivo favoreciendo el incremento de nematodos enemigos naturales de los

nematodos agalladores especialmente del orden Dorylaimida, Monochida y Diplogasterida, estos actúan como depredadores naturales de los nematodos agalladores por lo tanto la población de éstos se ve afectada (Bilgrami and Brey, 2005). Éste efecto se observó en el tratamiento de alfalfa molida, además que los materiales verdes al descomponerse liberan sustancias con efecto nematicidas en el suelo (Akhtar, 1993) por lo cual el uso de éste material resultó efectivo. Johnson et al. (1967) observó en el cultivo de jitomate que cuando incorporó al suelo alfalfa verde la población de *Meloidogyne incognita* fue significativamente suprimida. Las saponinas son glucósidos que se producen en las plantas y que tienen propiedades antimicrobiales que tienen un efecto nematicida (Sparg et al., 2004), lo cual es uno de los compuestos que pueden actuar contra supresor de *M. arenaria* cuando incorporamos al suelo alfalfa verde molida.

La incorporación de vermicomposta resultó uno de los mejores tratamientos ya que se redujo la población de *M. arenaria* considerablemente, se conocen múltiples beneficios en la aplicación de vermicomposta, dentro de éstos que provee estructuración de los suelos, promueve la proliferación de organismos benéficos, aumenta la fertilidad de los suelos, entre otros (Aktar and Malik, 2000; Oka, 2010). Pérez et al., (2010) encontró los mismos resultados en el manejo de *Nacobbus aberrans* cuando dentro de su control integrado hizo uso de vermicomposta.

De igual forma la gallinaza es un abono orgánico con mayor contenido de nitrógeno orgánico que al mineralizarse en el suelo se desprenden sustancias volátiles como el amoníaco que causan la muerte de los nematodos agalladores (Rodríguez-Kábana, 1986) de e tal manera que resultó viable su uso en el control de la población de *M. arenaria* en el cultivo de guayabo, además que proporciona buenas condiciones en el suelo para el óptimo desarrollo del cultivo.

La combinación de *P.chlamydosporia* con los abonos orgánicos en la mayoría de las repeticiones resulto ser más efectiva en cuanto al control de la población de los nematodos agalladores, el tratamiento más efectivo fue el uso de vermicomposta más *P. chlamydosporia* ya que en el sitio de cerro colorado redujo el 90 % de la población inicial y en el sitio de la florida fue el 95 %, coincidiendo con los

resultados de Pérez *et al.*, (2010) que cuando combinaron diferentes estrategias de manejo, el efecto en el control de población *N. aberras* resultó más exitoso.

La incorporación de abonos orgánicos al suelo favorece el establecimiento de *P.chlamydosporia* como control biológico, influye de manera positiva en el establecimiento de la misma, en la colonización de raíces y en el parasitismo de huevos, además que el uso de éstos materiales proporciona las condiciones adecuadas para el establecimiento del hongo en el suelo para la futura colonización de las raíces y al tener más volumen de material por la mezcla la aplicación del hongo se facilita. Puertas e Hidalgo, (2009) también reportaron éstos efectos y recomiendan la aplicación de estiércol vacuno y humus como soporte del uso de *P. chlamydosporia* como control biológico de nematodos agalladores.

La variación en el número de juveniles (J2) de *M. arenaria* encontrados en el muestreo final está condicionado por la población inicial de éstos nematodos en cada árbol, debido a que una de las características de los nematodos agalladores es que su distribución en el cultivo es en agregados, por lo tanto se presentaron árboles con mayor población de éstos nematodos al inicio del experimento lo que condicionó todos los resultados de las variables evaluadas.

La incorporación de los abonos orgánicos además de mejorar las propiedades físicas y biológicas del suelo también proporcionaron nutrientes, por lo cual las plantas aumentaron su tamaño de hoja, mejoró la concentración de grados brix en frutos y el rendimiento de producción aumentó (Aktar and Malik, 2000). La reducción de la población de los nematodos agalladores puede representar un cambio en algunas variables de la planta por lo que al combinar abonos orgánicos más *P. chlamydosporia* la población de *M. arenaria* se redujo considerablemente y el rendimiento se incrementó al igual que el área foliar, y algunos parámetros de la fruta. Van der Laan (1956) reporta que el uso de compostas reduce la densidad de población de *Heterodera rostochiensis* en papa.

Gonzales and Canto.Saenz (1993) encontraron que la incorporación de gallinaza reduce los nematodos formadores de quistes y aumenta el rendimiento en el cultivo de la papa, lo mismo sucede con *Tylenchulus semipenetrans* en cítricos.

VII. CONCLUSIONES

De los muestreos realizados en los lotes experimentales de guayabo se encontró la presencia del nematodo agallador *Meloidogyne arenaria*.

Pochonia chlamydosporia var. *chlamydosporia* fue aislado tanto de raíces como del suelo en la zona oriente del estado de Michoacán con potencial para regular la población de *M. arenaria*.

El uso de *P.chlamydosporia* en combinación con vermicomposta fue el mejor tratamiento, ya que redujo en un 90% la población de juveniles (J2) de *M. arenaria* en el sitio de cerro cerro colorado y el 95% en el sitio la florida, por lo tanto se recomienda el uso de éste tratamiento para el control de los nematodos agalladores en guayabo.

El uso de los abonos orgánicos modifica la fauna nematológica del suelo, incrementando los nematodos de vida libre como *Tylenchus* sp., *Psilenchus* sp., *Milonchulus* sp., *Prismatolaimus* sp., *Butlerius* sp., *Desmoscolex* sp. algunos del orden Rhabditida y Dorilaimida.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Avelar, M.J.J., Téliz, O.D., Zavaleta, M.E. 2001.** Patógenos asociados con el “Declinamiento del guayabo”. Revista Mexicana de Fitopatología Julio-Diciembre, Vol. 19, numero 002. Ciudad Obregón, México. Pp.223-229.
- Abad, P. Favery B, Rosso MN, Castagnone-Sereno P. 2003.** Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. Mol. Plant Pathol. 4, 217-224.
- Akhtar, M. 1993.** Utilization of waste materials in nematode control: a review. Bioresource Technology. 45: 1-7.
- Akhar, M., Malik, A. 2000.** Roles of organic soil amendments and soil organism in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. Bioresource Technology. 74: 35-47.
- Arevalo, J., Hidalgo-Díaz, L., Martins, I., Souza, J.F., Castro, J.M.C., Carneiro, R.M.D.G., Tigano, M.S. (2009).** Cultural and morphological characterization of *Pochonia chlamydosporia* and *Lecanicillium psalliotae* from *Meloidogyne mayaguensis* eggs in Brazil. Tropical Plant Pathology. 34 (3): 158-163.
- Ayoub, S. M. 1977.** Plant Nematology. An Agricultural Training Aid. Department of Food and Agriculture. Division of Plant Industry. Laboratory Services-Nematology. USA. 157 p.
- Barres, M.T., Bello A., Jordá C., Tello JC. 2006.** La eliminación de bromuro de metilo en la protección de cultivos como modelo mundial para la conservación del medio ambiente. MAPA. Madrid, 515 pp.
- Barron, G.L. 1977.** The nematode-destroying fungi. Topics in mycology No. 1 Canadian Biological Publications, Guelph.
- Bello, A., Tello J.1998.** El bromuro de metilo se suprime como fumigante del suelo. *Phytoma españa* 101, 10-21.
- Bello, A, Díez-Rojo MA, López Pérez JA, Castro I, Gallego A. 2010.** Biodesinfección de Suelos. Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE), Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, Madrid.
- Bello, A. López-Pérez JA, Sanz R, Escuer M, Herrero J. 2000.** Biofumigation and organic amendments. Regional Workshop on Methyl Bromide Alternatives for North Africa and Southern European Countries, United Nations Environment Programme (UNEP), Francia, 113-141.

- Bezooijen, J.V. 2006.** Methods and Techniques For Nematology. Wageningen, N. 108 p.
- Bilgrami, A.L., Brey, C. 2005.** Potential of Predatory nematodes to control plant-parasitic nematodes. In: Grewal, P.D., Ehlers, U., Shapiro-Ilan, D. (Eds), Nematodes as biocontrol agents. CABI. Publishing Wallingford, Uk, pp.447-464.
- Bourne, J.M. and Kerry B.R. 2002.** A manual for research on *Verticillium chlamydosporium*, a potential biological control agent for root-knot nematodes. Darmstadt. Germany. IOBC; OILB, WPRS/SROP.
- Browning, M., Dawson, C., Alm, S.R., Görres, J.H., Amador, J.A., 2004.** Differential effects of butyric acid on nematodes from four trophic groups. Applied Soil Ecology. 27: 47-54.
- Browning, M., Wallace, D.B., Dawson, C., Alm, S.R., Amador, J.A., 2006.** Potential of butyric acid for control of soil-borne fungal pathogens and nematodes affecting strawberries. Soil Biology and Biochemistry. 38: 401-404.
- Cepeda, S.M., E. González G., G. Gallegos M., J.S. Padilla R., L. Reyes M., M.A. Perales de la C., y H.R. Reyes P. 2003.** El nematocida Ditera (*Myrothecium verrucaria*) una alternativa biológica para el control de nematodos en guayaba. In: J. S. Padilla R., L. Reyes M., E. González G., y M.A. Perales de la C (eds.). Memoria. Primer simposio Internacional de la guayaba. Aguascalientes, México. pp: 222-228.
- Conn, K.L. Tenuta, M., Lazarovits, G., 2005.** Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acid, nitrous acid, and/or ammonia toxicity. Phytopathology 95: 28-35.
- Cid del Prado. V.I., Soto, T.A., Hernández, J.A. 2001.** Distribución especies y razas de *Meloidogyne* en México. Revista Mexicana de Fitopatología 19:32-39.
- Chitwood, B.G. 1949.** Root-Knot nematodes Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goldi, 1887. Proc. Helminthol.Soc. Wash. 16:90-104.
- Eisenback, D.J., Triantaphyllou, H.H. 1991.** Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker, Inc. New York, 191-274 pp.

- Eisenback, D.J., Sasser y C. Carter. 1985.** Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). En: An advanced treatise on *Meloidogyne*. Biology and control. International Meloidogyne Project. North Carolina State University Graphics, Raleigh. 95-112 p.
- El-baradi, T.A., 1975.** Guayaba: review article, abstr.Trop.Agric. 1:9-16.
- Franco, N.F., Del Prado V.C.I. y Romero T.M.D.L.2012.** Aislamiento y potencial parasítico de un aislamiento nativo de *Pochonia chlamidosporia* en contra de *Nacobbus aberrans* en frijol. Revista mexicana de fitopatología. (30): 2 pag. 101-113.
- Gamms, W. 1988.** A Contribution to the Knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. Neth.J.Pl.Path.94: 123-148.
- García, E. (2002).** Modificaciones al Régimen de Clasificación Climática de Köppen, México.
- García, Álvarez A. Arias M, Díez. Rojo M.A, Bello A. 2004.** Effect of agricultural management on soil nematode trophic structure in a mediterranean cereal system. Appl. Soil Eco. 27, 197-210.
- Gonzáles, A., Canto-Sanenz, M., 1993.** Comparison of five organic amendments for the control of *Globodera pallida* in microplots in Peru. Nematropica 23: 133-139.
- González, G.E. 1989.** Fluctuación poblacional de moscas de la fruta en guayabo en el Cañon de Juchipila, Zac.(3 er Año). Informe anual de Inv. SARH-INIFAP-CIFAP-ZAC. Campo Exp. De los Cañones, México 30 p.
- González, G.E. 1991.** La mosca de la fruta en el Cañon de Juchipila, Zacatecas. Folleto técnico No. 4. SARH-INIFAP-CIFAP-ZAC Campo Exp. de los Cañones, México, 15 p.
- González, G. y Perales., de la C.M.A.1993.** Panorámica de la región Calvillo-Cañon del Juchipila. Dcto. De circulación interna. SAHR-INIFAP-CIFAP-ZAC Campo Exp. De los Cañones, México, 15 p.
- González, G. 1994.** Picudos del género *Conotrachelus* (Coleóptera:Curculionidae) asociados a guayaba (*Psidium guajava* L.) y su importancia en el cañon de Juchipila, Zac. Tesis de Maestría en Ciencias. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 77 p.
- González G.,E. 1986.** Exploración fitopatológica y determinación de los principales artrópodos plaga que afectan al cultivo del guayabo en la región de

Calvillo-Cañon de Juchipila. Informe anual de Inv. SARH-INIFAP-CIANOC-CEDEC.21 p.

González G, E., Padilla R, J.S., Reyes M, L., Perales DLC, M.A., Esquivel, V., F. 2002. Guayaba: Su cultivo en México. Aguascalientes, México, INIFAP, Centro de Investigación Regional Norte Centro, Campo Experimental Pabellón. Libro Técnico No. 1. 182 p.

González G, E.2009. Identificación y Control de Nematodos que Afectan al Cultivo del Guayabo en México. Aguascalientes, México, INIFAP, Centro de Investigación Regional Norte Centro, Campo Experimental Pabellón. Libro Técnico No. 6. 154 p.

Hartman, K.M., Sasser, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. Journal Nematology. 69-77 pp.

Hidalgo, D.L., Bourne, M.J., Kerry, B.R., Rodriguez, M.G. 2000. Nematophagus *Verticillium* spp. In soils infested with *Meloidogyne* spp. In Cuba: Isolation and screening. International Journal of Pest Management 46: 277-284.

Hooper, D. J. 1986a. Extraction of free-living stages of soil. In: Laboratory methods for work with plant and soil nematodes (J. F. Southey). Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Reference Book 402. London: Her Majesty's Stationery Office. pp. 5-30.

Jansson H.B, López-Llorca LV, 2001. Biology of nematophagous fungi. In: Misra JK, Horn BW (eds). Trichomycetes and other fungal groups. Science Publishers, Enfield, pp 145-173.

Johnston, T.M., 1959. Antibiosis of *Clostridium butyricum* Prazmowski on *Tylenchorhynchus martini* fielding. 1956 (Nematoda; Phasmodia), in submerged rice soil. Ph.D. Thesis, Louisiana State University, Baton Rouge, LA.

Jhonson, L.F., Chambers, A. Y. & Reed, H. E. (1967). Reduction of root-knot of tomatoes with crop residue amendments in field experiments. Plant Disease Repr, 51: 219-222.

Kaplan, M., Noe, J.P., 1993. Effect of chicken-excrement amendments on *Meloidogyne arenaria*. Journal Nematology 25: 71-77.

Kerry BR, Bourne JM, 2002. A manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*, a Potential Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes. IOBC/WPRS, University of Gent.

- Kerry BR. 2001.** Exploitation of the Nematophagous Fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the Biological Control of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editores. Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. CAB International, Wallingford. p. 155-168.
- Kirkegaard, J.A., Gardner, P.A., Desmarchelier, J.M., Angus, J.F., 1993.** Biofumigation-using Brassica species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. In: Wratten, N., Mailer, R.J. Proceeding 9th Australian Research Assembly on Brassicas, Agricultural Research Institute, Wagga Wagga, New South Wales, 77-82 pp.
- Kubo, C., Ushio, S., Katase, M., Takeuchi, T., 2005.** Analysis of factors involved in sterilization effect by soil reduction. Journal Phytopathology. 71: 281-282.
- Lazarovits, G., Tenuta, M., Conn, K.L., 2000.** Utilization of high nitrogen and swine manure amendments for control of soil-borne diseases: efficacy and mode of action. Acta Horticulturae. 532: 59-64.
- Lazarovits, G. 2004.** Managing soilborne plant diseases through selective soil disinfestation by a knowledge based application of soil amendments. Phytoparasitica 32, 427-431.
- Lacey, L.A., and Brooks, W.M. 1997.** Initial handling and diagnosis of diseased insects. Manual of techniques in insect pathology. Chapter I. pag.1-10.
- Leij, F.A.A.M; Kerry, B.R. and Dennehy, J.A. 1993.** *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot test. Nematologica 39,115-126.
- Lipa, J. J.; Slizynski, K.1973.** Instructions on methods and terminology for the calculation of the median lethal dose LD50 in insect pathology and toxicology. Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roslin 1974; 15(1): 59-83
- Lopez-Llorca L.V., Borge., J.H.,Gaspar J.M.V., Salinas J.2006.** Nematophagus Fungi as Root Endophytes. Soil Biology. Vol. 9. 191-206 p.
- Maldonado, P.R., Trinidad S.A., Teliz, O.D., Velasco, V.V y Volke H.V. 2012.** Respuesta del Litchi a la Fertilizacion con NPK en el Norte de Oaxaca, Mexico. Rev. Fitotec.Mex.Vol.35 (3):251-258
- Malo, S.E. y C.W. Campbell, 1968,** Fruit Crop Fact Sheet. The Guava, Florida Cooperative Extension Service, University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences.

- Mata B.,I. y Rodríguez, M. 1990.** Cultivo y producción de guayabo. Ed. Trillas 2da. Edición. 160 p.
- Matthiessen, J.N., Kirkegaard, J.A., 2006.** Biofumigation and enhanced biodegradation: Opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. *Crit. Rev. Plant Science*. 25: 235-265.
- Marquina, V.; Araujo, L; Ruiz, J.; Rodríguez, A. 2008.** Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición, ALAN*. 58(1)1-10.
- Manzanilla-López, R.H., Esteves, I., Finetti-Sialer, M.M., Hirsch, P.R., Ward, E., Devonshire, J., Hidalgo-Díaz, L. 2013.** *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*. 45 (1): 1-7.
- Medina-Canales, M.G., Rodriguez-Tovar, A.V., Manzanilla-Lopez, R.H., Zuñiga, G. and Tovar-Soto, A. 2013.** Identification and Molecular Characterisation of new maxican isolates of *Pochonia chlamydosporia* for the management of *Meloidogyne* spp. *Biocontrol science and Technology*, 24:1.1-21.
- Mendoza L., M.R., A. Luis A., S.F. Castillo O., I. Vidales F. 2005.** Diagnóstico del manejo actual del cultivo de guayaba en la región oriente de Michoacán. *Publicación Especial núm.1. INIFAP. Uruapan, Mich.* 49 p.
- Mitkowski, N.A. and Abawi G.S 2003.** Nematode das galhas. 2011. *The Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2011-03-29-01
- McElderry, C.F., Browning, M., Amador, J.A., 2005.** Effect of short-chain fatty acids and soil atmosphere on *Tylenchorhynchus*. *Journal Nematology*. 37: 71-77.
- Momma, N., Yamamoto, K., Simandi, P., Shishido, M., 2006.** Role of organic acids in the mechanisms of biological soil disinfestations. *Journal General Plant Pathology*. 72: 247-252.
- Montes-Belmont, R. 2000.** Nematología vegetal en México, Investigación documental. *Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Segunda edición, 98 pp.
- Mumm, R., Burow, M., Bukovinszky, G., Kazantzidou, E., Wittstock, U., Dicke, M., Gershenzon, J., 2008.** Formation of simple nitriles upon glucosinolate hydrolysis affects direct and indirect defense against the specialist herbivore, *Pieris rapae*. *Journal of chemical Ecology*. 34: 1311-1321.

- Min, Y.Y., Sato, E., Shirakashi, T., Wada, S., Toyota, K., Watanabe, A., 2007.** Suppressive effect of anaerobically digested slurry on the root lesion nematode *Pratylenchus penetrans* and its potential mechanisms. *Journal Nematology* 37: 93-100.
- Naranjo, N.A y Cortés, B.J. 1982.** Evaluación de nematocidas para el control de nematodos en guayabo en la zona del Cañón de Juchipila, Zacatecas. CONAFRUT-Zac. 13p.
- Ochse, J.J. et al., 1976,** Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales, vol. I, Limusa, México.
- Oka, Y. 2010.** Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments- A review. *Journal Applied Soil Ecology*. 44 (2010) 101-115.
- Oka, Y., Shapira, N., Fine, P., 2007.** Control of root-knot nematodes in organic farming system by organic amendments and soil solarization. *Crop Prot.* 26: 1556-1565.
- Oka, Y., Tkachi, N., Shuker, S., Rosenberg. R., Suriano, S., Fine, P., 2006.** Field studies on the enhancement of nematicidal activity of ammonia-releasing fertilizers by alkaline amendments. *Nematology* 8: 881-893.
- Oka, Y., Chet, I., Spiegel, I., 1993.** Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. *Biocontrol Sci. Technol.* 3: 115-126.
- Oka, Y. 2010.** Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments- A review. *Applied Soil Ecology*. 44 (2010) 101-115.
- Orton, W. K.J. 1972.** *Meloidogyne javanica*. C.I.H. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes, Set 1, N° 3,4 pp.
- Orton, W. K.J. 1973.** *Meloidogyne incognita*. C.I.H. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes, Set 2, N° 18, 4 pp.
- Orton, W. K.J. 1974.** *Meloidogyne hapla*. C.I.H. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes, Set 3, N° 31, 4 pp.
- Orton, W. K.J. 1975.** *Meloidogyne arenaria*. C.I.H. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes, Set 5, N° 62, 4 pp.
- Olivera, F.M.E. 2012.** Evaluación de subproducto obtenido en la elaboración de jugos de mango y guayaba como fuente de fibra antioxidante. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro, México, Facultad de Química. 59 p.

- Patrick, Z.A., Sayre, R.M., Thorpe, H.J., 1965.** Nematicidal substances selective for plant-parasitic nematodes in extracts of decomposing rye. *Phytopathology* 55: 702-704.
- Peralta, M.R., Trinidad S.A., Téliz O.D., Velasco V.V., Volke H.V.H.2012.** Respuesta del litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) a la fertilización con NPK en el norte de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol.35 (3) 251-258 p.
- Pérez, R.I; Franco N.F; Cid Del Prado y Zavaleta MF. 2010.** Control de *Nacobbus aberrans* en chile ancho (*Capsicum annum* L.) mediante el uso combinado de enmiendas orgánicas, hongos nematófagos y nematicidas. *Nematológica* 41: 122-129.
- Pérez, R.I. 2004.** Eficiencia de cinco aislamientos del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* Godard para el control de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen 1944, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Tesis de licenciatura. ITA 29. Tlaxcala. 64 p.
- Pratt PF, Broadbent FE, Martin JP. 1973.** Using organic wastes as nitrogen fertilizers. *California agriculture* 27(6): 10-13.
- Piedra Buena A. 2004.** Agroecología de *Meloidogyne Göldi*, 1892 (Nematoda: Heteroderidae) en Cultivos Hortícolas Protegidos. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Almería, 397 pp.
- Puertas, A., Arévalo, Jersys., Montes de Oca, N., Miranda, I., Hidalgo,L. 2006.** Efecto de diferentes concentraciones de inóculo de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* en el control de *Meloidogyne incognita*. *Revista de Protección Vegetal* (21) 2: 74-79.
- Puertas, A., Hidalgo, L. (2009).** Efecto de diferentes abonos orgánicos sobre el establecimiento de *Pochonia chlamydosporia* var. *Catenulata* en el sustrato y la rizósfera de plantas de tomate. *Protección vegetal* 3: 162-165.
- Quijano C.,C.E; Suárez M. y Duque, C. 1999.** Constituyentes volátiles de dos variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.): Palmira ICA-1 y Glum Sali. *Revista Colombiana de Química*. Vol. 28 (1).
- Riegel, C., Noe, J.P., 2000.** Chiken litter soil amendment effects on soilborne microbes and *Meloidogyne incognita* on cotton. *Plant Disease* 84: 1275-1281.
- Rodríguez-Kábana R. 1986.** Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. *J. Nematol.* 18, 129-135.

- Rodríguez-Kábana, R., Morgan-Jones, G., Chet, I., 1987.** Biological control of nematodes: soil amendments and microbial antagonists. *Plant Soil* 100: 237-247.
- Ruehle, G.D., 1968.** Merece atención el cultivo de la guayaba; *Revista la hacienda*. 63 (4): 43-46.
- Rodríguez-Kabana R. 1996.** Alternatives to MB soil fumigation. In: A bello, JA González, M. Arias, R Rodríguez-Kábana (Eds). Alternatives to MB for the Southern European Countries. Gáficas Papallona S.C.V, Valencia, 17-34.
- Sánchez R., G. 2007.** La red de Valor Guayaba en el oriente del Estado de Michoacán. Bases para un desarrollo regional competitivo y sustentable. Fundación Produce Michoacán. Morelia, Mich. 134 p.
- Sanjinez, E. J.; Cunha, R.L.; Menegalli, F.C.; Hubinger, M.D. 2005.** Evaluation of total carotenoids and ascorbic acid in osmotic pretreated guavas during convective drying. *Italian J. of Food Sci.* 17 (3): 205-314.
- Sasser, J.N.1980.** Root-Knot nematodes:a global menace to crop production. *Plant Dis.*64:36-41
- Sayre, R.M., Patrick, Z.A., Thorpe, H.J., 1965.** Identification of a selective nematicidal component in extracts of plant residues decomposing in soil. *Nematologica* 11: 263-268.
- SIAP. 2012.** Servicio de Información y estadística Agroalimentaria y Pesca: Año Agrícola 2012. México
- Siddiqui, M.R. 2000.** Tylenchida Parasites of Plants and Insects. CABI,UK, 833 pp.
- Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J., 2004.** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal Ethnopharm.* 94: 219-243.
- Spiegel, Y., Chet, I., Cohen, E.1987.** Use of Chitin For Controlling Plant Parasitic nematodes. II. Mode of action. *Plant Soil* 98: 337-345.
- Stirling, G.R. (Edt.) 1991.** Biological control of plant parasitic nematodes; Progress, problems and prospects. CAB International, Wallingford, Oxon, 282 pp.
- Taba, S., Tomoyose, M., Moromizato, Z., 2006.** Control mechanism associated with rice bran-amended soil for root-knot nematode. *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Nematology* 16: 126-133.
- Taylor, A.L. y Sasser, J.N. 1978.** Biología, Identificación y Control de los nematodos de nódulo y raíz (especies de *Meloidogyne*). Departamento de

- Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte, USA. 111 p.
- Taylor, A.L., J.N.Sasser and L. A.Nelson. 1982.** Relationship of climate and soil characteristics to geographical distribution of *Meloidogyn* species in agricultural soils. Coop.Publ.Dep. Plant Pathol., North Carolina State Univ., and U.S. Agency Int. Dev. Raleigh, N.C. 65 pp.
- Tejada, L., 1980,** Estudio sobre los hospederos potenciales de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* Weid., con énfasis en las presentes el área del soconusco, Boletín, SARH, Chiapas, México.
- Tenuta, M., Lazarovits, G., 2002.** Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Phytopathology 92: 255-264.
- Tenuta, M., Conn, K.L. Lazarovits, G., 2002.** Volatile fatty acids in liquid swine manure can kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Phytopathology 92: 548-552.
- Valdivia, J.S.A, Trinidad-Santos, R.A. Muños- Márquez T (2010).** Nutritional survey of lychee on the coast area of the gulf of México. Acta Hort. 863:413-423.
- Van der Laan, P.A., 1956.** The influence of organic manuring on the development of the potato eelworm, *Heterodera rostochiensis*. Nematologica 1: 112-115.
- Velázquez, M.J.1979.** El picudo de la guayaba en la región de Calvillo, Aguascalientes y Jalpa, Zacatecas. CAEPABINIA-SARH. Desplegable No 1.
- Velázquez, M.J.1981.**La mosca de la fruta *Anastrepha* spp en la región. de Calvillo, Aguascalientes y Jalpa, Zacatecas. Memorias III Congreso Nacional de Fruticultura. Guadalajara, Jalisco. P.28.
- Villaseñor, L., C.A., 1977.** Perspectivas del mercado de la guayaba *Psidium guajava* L. en México (Estudio de caso en Calvillo, Ags.), Tesis profesional, ENA, Chapingo, México.
- Volke, H.V., Camacho, B.R., Sánchez, G.P., Rebollar, A.A. y Ruiz, R.F. 2012.** Manual de producción de guayaba en la región oriente del estado de Michoacan.Sistema Producto Guayaba Michoacan;COFUPRO: Colegio de Postgraduados, Montecillos, Mex. P.13.

- Vrain, A.T.C. 1977.** Technique for the Collection of Larvae of *Meloidogyne* spp. and a Comparison of Eggs and Larvae as Inocula. *Journal of Nematology*, Volume 9, No. 3.
- Walker, J.T., 1971.** Populations of *Pratylenchus penetrans* relative to decomposing nitrogenous soil amendments. *Journal Nematology*. 3: 43-49.
- Williamson V.M., Gleason CA. 2003.** Plant-nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 327-333.
- Widmer, T.L. Abawi, G.S., 2000.** Mechanism of suppression of *Meloidogyne hapla* and its damage by a green manure of sudan grass. *Plant Disease*. 84:562-568.
- Widmer, T.L. Abawi, G.S., 2002.** Relationship between levels of cyanide in sudangrass hybrids incorporated into soil and suppression of *Meloidogyne hapla*. *Journal Nematology*. 34: 16-22.
- Xiao, J., Zhu, J., Chen, S., Ruan, W., Miller, C., 2007.** A novel use of anaerobically digested liquid swine manure to potentially control soybean cyst nematode. *Journal Environmental Science Health* 42: 749-757.
- Yam, T.J.A. Villaseñor, P. C.A, Romantchik, K, E. Soto, E, M. Peña, P, M.A. 2010.** Una revisión sobre la importancia del fruto de Guayaba (*Psidium guajava* L.) y sus principales características en la postcosecha. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 19 (4): 74-82.