



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSGRADO EN FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

**EFFECTO DE QUITINA Y QUITOSANO SOBRE HUEVOS Y JUVENILES DE
NEMATODOS FORMADORES DE NODULOS RADICULARES, *Nacobbus aberrans* Y
Meloidogyne incognita. BAJO CONDICIONES *in vitro* e *in vivo***

JUAN FERNANDO SÁNCHEZ PORTILLO

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO TEXCOCO ESTADO DE MÉXICO

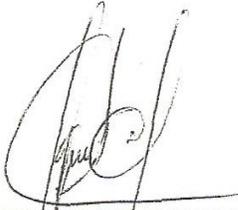
2010

La presente tesis titulada: **EFFECTO DE QUITINA Y QUITOSANO SOBRE HUEVOS Y JUVENILES DE NEMATODOS FORMADORES DE NODULOS RADICULARES, *Nacobbus aberrans* Y *Meloidogyne incognita*. BAJO CONDICIONES *in vitro* e *in vivo*.**, realizada por el alumno: **Juan Fernando Sánchez Portillo**, 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
FITOPATOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. IGNACIO CID DEL PRADO VERA

ASESOR:


DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS

ASESOR:


DRA. C. KEIKO SHIRAI MATSUMOTO

ASESOR:


DR. GUSTAVO RAMÍREZ VALVERDE

Montecillo, Texcoco, México, Enero de 2010

AGRADECIMIENTOS

Al H. CONACyT por la beca que recibí a lo largo de mi maestría en el Colegio de Postgraduados y en general al pueblo Mexicano que sin sus aportaciones no existiera el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como la formación de científicos a nivel Nacional, gracias.

Al Colegio de Postgraduados por todos los recursos humanos e infraestructura invertidos en mi formación.

Al Dr. Ignacio Cid del Prado Vera, por aceptar ser mi consejero particular de igual manera agradecer haberme considerado para compartir de manera conjunta en algunas de las actividades inherentes al manejo de nematodos fitopatógenos, sobre todo en campo donde debemos aplicar los conocimientos adquiridos y transmitirme sus experiencias profesionales.

A la Dra, Raquel Alatorre Rosas por todas las enseñanzas, consejos, pero sobretodo su apoyo incondicional, su disposición para apoyarme en la realización de este trabajo de investigación tanto en la fase de investigación como de escritura, agradecer la oportunidad de apoyarme para tener el contacto con la Dra. Shirai; además me llevo su disciplina en mi formación profesional, y le agradezco haber aceptado formar parte de mi comité académico, gracias Doctora.

A la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto por su apoyo brindado en la fases de investigación sobre todo en la aportación del material de quitina-quitosano, gracias a ello fue posible evaluar el biopolímero natural, parte medular de esta tesis, gracias por su disposición y su colaboración y agradezco haber formado parte de mi comité académico.

Al Dr. Gustavo Ramírez Valverde por su apoyo, dedicación así como sus sugerencias para determinar el modelo estadístico a desarrollar como para interpretar los resultados obtenidos. Sin pasar por alto agradecer haber formado parte de mi comité.

CONTENIDO

RESUMEN	VIII
ABSTRACT.....	
INDICE DE CUADROS	X
INDICE FIGURAS	XI
1 INTRODUCCION GENERAL.....	1
2 HIPOPTESIS.....	4
3 OBJETIVO GENERAL	4

Capítulo I

REVISION DE LITERATURA

4.1. El nematodo nodulador <i>Meloidogyne incognita</i>	5.
4.1.1 Diagnostico	5
4.1.2 Importancia económica	5
4.1.3 Distribución geográfica	5
4.1.4 Clasificación taxonómica	6
4.1.5 Ciclo de vida	7
4.1.6 Sintomatología	15
4.1.7 Hospederos	16
4.1.8 Métodos de Control ...1.....	17
4.2 El nematodo falso nodulador <i>Nacobbus aberrans</i>	21
4.2.1 Diagnostico	22
4.2.2 Importancia económica	24
4.2.3 Distribución geográfica	24
4.2.4 Clasificación taxonómica	25
4.2.5 Ciclo de vida	26
4.2.6 Sintomatología	28
4.2.7 Hospederos	29
4.2.8 Métodos de Control	31
4.2.8.1 Genético	31
4.2.8.2 Cultural	31
4.2.8.2.1 Soalarizacion del suelo	31

4.2.8.2.2 Aplicación de materia orgánica en suelo.....	32
4.2.8.3 Biológico.....	34
4.2.8.4 Químico.....	37
4.3 Biopolimero Natural quitina quitosano.....	38
4.3.1 Introducción.....	38
4-3.2 Procesos de obtención por la vía microbiana.....	41
4.3.3 Procesos de obtención por la vía ácido alcalí.....	42
5.1 Propiedades de quitina.....	43
5.2 Propiedades de quitosano.....	44
5.3 Aplicaciones.....	45
5.4 Uso de quitina-quitosano en el manejo de fitopatógenos.....	46
5.5 Modo de acción de quitosano.....	52
5.6 LITERATURA CITADA.....	53

Capítulo II

EFFECTO DE QUITINA Y QUITOSANO SOBRE HUEVOS Y JUVENILES DEL NEMATODO FORMADOR DE FALSOS NODULOS RADICULARES, *Nacobbus aberrans* BAJO CONDICIONES *in vitro* e *in vivo*

Resumen	69
Abstract.....	
6.1 Introducción	71
6.2 Materiales y métodos	72
6.3 Zona de muestreo	72
6.3.1 Obtencion de masas de huevecillos	73
6.3.2 Obtencion de huevecillos aislados	74
6.3.3 Obtencion de juveniles infectivos (J ₂)	74
6.3.4 Preparacion de la solución stock de quitna-quitosano	75
6.3.5 Bioensayo in vitro 1. Efecto de quitina-quitosano para inhibir la eclosión de masas de huevecillos	76

6.3.6 Bioensayo in vitro 2. Efecto de quitina-quitosano para inhibir la eclosión de huevos aislados	77
6.3.7 Bioensayo in vitro 3. Efecto de quitina-quitosano para evaluar la propiedad nematostático o nematicida sobre larvas infectivas (J ₂)	77
6.3.8 Bioensayo in vivo 4. Efecto de quitosano (Q1) 2000 ppm, en la interacción nematodo-planta para inhibir la invasión de J ₂	78
6.4 Analisis estadístico	80
6.5 Resultados	80
6.5.1 Identificación del nematodo colectado	80
6.5.2 Efecto de quitina-quitosano en la eclosión de huevecillos	81
6.5.3 Masas de huevecillos	81
6.5.4 Huevecillos aislados	82
6.5.5 Efecto de quitina-quitosano en la inmovilización de estadios juveniles J ₂	83
6.5.6 Efecto de quitosano (Q1) 2000 ppm, en la inhibición de invasión de estadios juveniles J ₂ en plántula	85
6.6 Discusión	86
6.7 LITERATURA CITADA	87

Capítulo III

EFFECTO DE QUITINA Y QUITOSANO SOBRE HUEVOS Y JUVENILES DEL NEMATODO FORMADOR DE NODULOS RADICULARES, *Meloidogyne incognita*. BAJO CONDICIONES *in vitro* e *in vivo*

Resumen.....	90
Abstract.....	
7.1 Introducción.....	92
7.2 Materiales y métodos.....	93
7.3 Zona de muestreo.....	93
7.3.1 Obtención de masas de huevecillos.....	95
7.3.2 Obtención de huevecillos aislados	95
7.3.3 Obtención de juveniles infectivos (J ₂)	96
7.3.4 Preparación de la solución stock de quitina-quitosano	97

7.3.5 Bioensayo in vitro 1. Efecto de quitina-quitosano para inhibir la eclosión de masas de huevecillos	97
7.3.6 Bioensayo in vitro 2. Efecto de quitina-quitosano para inhibir la eclosión de huevos aislados	98
7.3.7 Bioensayo in vitro 3. Efecto de quitina-quitosano para evaluar la propiedad nematistático o nematicida sobre larvas infectivas (J ₂)	98
7.3.8 Bioensayo in vivo 4. Efecto de quitosano (Q1) 2000 ppm, en la interaccion nematodo-planta para inhibir la invasión de J ₂	99
7.4 Analisis estadístico	100
7.5 Resultados	101
7.5.1 Identificación del nematodo colectado	101
7.5.2 Efecto de quitina-quitosano en la eclosión de huevecillos	102
7.5.3 Masas de huevecillos	102
7.5.4 Huevecillos aislados	103
7.5.5 Efecto de quitina-quitosano en la inmovilización de estadios juveniles J ₂	104
7.5.6 Efecto de quitosano (Q1) 2000 ppm, en la inhibición de invasión de estadios juveniles J ₂ en plántula	105
7.6 Discusión	106
7.7 DISCUSIÓN GENERAL	106
7.8 CONCLUSION GENERAL	109
7.9 LITERATURA CITADA	110
8 ANEXO	113
GLOSARIO	118

**EFFECTO DE QUITINA Y QUITOSANO SOBRE HUEVOS Y JUVENILES DE
NEMATODOS FORMADORES DE NODULOS RADICULARES, *Nacobbus aberrans* Y**

Meloidogyne incognita*. BAJO CONDICIONES *in vitro* e *in vivo

Juan Fernando Sánchez Portillo, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2010

RESUMEN

El nematodo agallador *Meloidogyne incognita* Kofoid y White, 1919, Chitwood, 1949, distribuido en 23 de los 32 estados del país y *Nacobbus aberrans* Thorne 1935, Thorne and Allen, 1944, distribuido en 10 de 32 estados de la República Mexicana, su combate para ambas especies, casi siempre se hace aplicando diferentes agroquímicos, los cuales algunos ya tienen problemas de registro. Se necesita evaluar nuevos productos que sean otra alternativa a su manejo y mas amigables al ambiente. En el presente trabajo se evaluó el efecto de quitina-quitosano con diferentes grados de desacetilación, biopolímeros naturales que poseen propiedades nematicidas y utilizados como reguladores de la población de estos fitonematodos; los estudios se hicieron *in vitro*, sobre la eclosión de masas de huevos, huevos aislados de la matriz gelatinosa, juveniles de segundo estadio (J₂) y el efecto *in vivo*, sobre la invasión de raíz en plántulas de chile CM-334. Se colectaron 240 muestras de suelo rizosférico del cultivo de chile en dos zonas de estudio, para *M. incognita*, en el ejido Jiquilpan municipio de Ahome Sinaloa, y para *N. aberrans*, 150 muestras en Montecillo municipio de Texcoco estado de México. De cada muestra se obtuvo masas de huevecillos para analizar la actividad nematicida de los biopolímeros, se compararon las concentraciones de 250, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm, en tres grados de desacetilación quitosano (Q1) kDA=100, quitina (Q2) kDA= 55 y quitina (Q3) kDA=27.

El mejor resultado *in vitro* posterior a 264hrs en masas de huevos tratadas de *M. incognita*, fue (Q1) 2000 ppm al obtener una media mínima de eclosión de 13.3, para huevos aislados fue (Q1) 2000 ppm y (Q1) 1000 ppm, que resultaron en una media de eclosión de 0.9 y 1.5 respectivamente, en juveniles J₂ después de 72hrs de su probable recuperación en agua destilada (Q1) 2000 ppm, obtuvo una media de inmovilidad de 186.6, comparados con los testigos (T) y (Q0) que obtuvieron una media mínima de inmovilidad de 20.2 y 46.5 respectivamente. Con respecto al bioensayo *in vivo*, el menor índice de invasión se observó en el tratamiento 0 días (0d) obteniendo el 9.8% de invasión comparados con los testigos (T) y (Q0) los cuales obtuvieron el 100% y 69.9% de invasión respectivamente en plántulas tratadas.

El mejor resultado *in vitro* en masas de huevos para *N. aberrans* posterior a 264hrs de tratamiento fue (Q1) 2000 y 1500 ppm obteniendo una media mínima en eclosión de 16.5 y 17.8 respectivamente, en huevos aislados fue (Q1) 1500, (Q1) 250 ppm, con una media mínima de eclosión de 0.8 y 1.1 respectivamente, con respecto al bioensayo de juveniles J₂ después de 72hrs de su probable recuperación, los mejores tratamientos fueron (Q1) 2000 y (Q2) 1500 ppm, con una media mínima de inmovilización de 145.9 y 140.5 respectivamente, comparados con los testigos (Q0) y (T) que obtuvieron una media de 27.1 y 51.9 respectivamente. En relación al bioensayo *in vivo*, el menor índice de invasión se observó a los 0 días (0d) de tratamiento resultando un 6% de invasión con respecto a los testigos (Q0) y (T), que obtuvieron una invasión de 49% y 100% respectivamente en los puntos de crecimiento de la raíz.

Palabras clave: Biopolímero natural, control, grados desacetilación, *M. incognita*, *N. aberrans*, quitina, quitosano.

ABSTRACT

The root-knot nematode *Meloidogyne incognita* Kofoid and White, 1919, Chitwood, 1949, distributed in 23 of the 32 states and *Nacobbus aberrans* Thorne 1935, Thorne and Allen, 1944, distributed in 10 of 32 states of Mexico, their control of both species is almost always done by different chemicals, some of which already have registration problems. We need to evaluate new products that are alternatives to their management and more friendly to the environment. In the present study we evaluated the effect of chitin-chitosan with different degrees of deacetylation, these natural biopolymers have nematocidal properties and are used as regulators of the population of these fitonematodes. Studies were made in vitro, on the hatching of egg masses eggs isolated from the gelatinous matrix, second-stage juveniles (J2) and the in vivo effect on the invasion of root in seedlings of chili CM-334. We collected 240 samples of rizospheric soil from chili peppers in two areas of study for *M. incognita*, on the Ejido Sinaloa Ahome Jiquilpan Township, and *N. aberrans*, 150 samples in the municipality of Texcoco, Montecillo Mexico State. From each sample were obtained egg masses to analyze the nematocidal activity of biopolymers, we compared the concentrations of 250, 500, 1000, 1500 and 2000 ppm in three degrees of deacetylation, chitosan (Q1) kDA = 100, chitin (Q2) kDA = 55 and chitin (Q) 3 kDA = 27. The best result after 264hrs in treated egg masses of *M. incognita* was (Q1) 2000 ppm with a minimum hatching average of 13.3. For isolated eggs (Q1) 2000 ppm and (Q1) 1000 ppm, resulting in an average of 0.9 and 1.5 eclosion respectively, J2 juveniles after 72 hr did not recover after treated (Q1) 2000 ppm, with an average of 186.6 immobility compared to controls (T) and (Q0) with an average immobility of 20.2 and 40.5 respectively. Regarding the in seedlings bioassay, the lowest rate of invasion was observed in treatment 0 days (0d) obtaining

9.8% of invasion compared with controls (T) and (Q0) which were 100% and 69.9% of invasion treated seedlings, respectively.

The best result in vitro on egg masses for *N. aberrans* 264hrs after treatment was (Q1) 2000 and 1500 ppm in obtaining a minimum average emergence of 16.5 and 17.8 respectively. For isolated eggs (Q1) 1500, (Q1) 250 ppm, with a hatching average of 0.8 and 1.1 respectively, with respect to J2 juvenile bioassay after 72hrs which we let to recover, the best treatments were (Q1) 2000 and (Q2) 1500 ppm, with a minimum immobilizing average of 145.9 and 140.5, compared with controls (Q0) and (T) which had an average of 27.1 and 51.9 respectively. Regarding the in vivo bioassay, the lowest rate of invasion was observed at 0 days (0d) of treatment resulting from invasion by 6% compared to controls (Q0) and (T), which were invaded 49% and 100% respectively at points of root growth. The chitin and chitosan have a nematicida effect that affects the J2, killing them and reducing the risks of roots invasion.

Keywords: chitin, chitosan, control, deacetylation, natural biopolymer, *M. incognita*, *N. aberrans*.

LISTA DE CUADROS

Capítulo 2.

- Cuadro 1. Bioensayo 1 *in vitro*. Comparación de medias de eclosión de masas de huevecillos..81
- Cuadro 2. Bioensayo 2 *in vitro*. Comparación de medias de eclosión de huevos aislados.....82
- Cuadro 3. Bioensayo 3 *in vitro*. Comparación de medias de inmovilidad de J₂.....83
- Cuadro 4. Bioensayo 4. Comparación del % de invasión de J₂ de *N. aberrans* en plántula de los tratamientos evaluados en concentración de 2000 ppm.....85

Capítulo 3.

- Cuadro 1. Bioensayo 1. Comparación de medias en eclosión en masas de huevos.....101
- Cuadro 2. Bioensayo 2. Comparación de medias en la eclosión de huevos aislados.....102
- Cuadro 3. Bioensayo 3. Comparación de medias en la inmovilidad de J₂103
- Cuadro 4. Bioensayo 4. Comparación del % de invasión de J₂ de *M. incognita* en plántula de los tratamientos evaluados en concentración de 2000 ppm.....104

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I.

Figura 1: Ciclo biológico de *M. incognita*. A) Etapa de embriogénesis, B) Segunda etapa larvaria ataca raíces, C) J₂ invade la raíz y forma células gigantes, D) J₂ Se alimenta de células gigantes y comienza a formar agallas, E) Tercera etapa larvaria, F) Cuarta etapa larvaria, G) Nematodos adultos, el macho abandona la raíz, H) Hembra deposita huevos en ovisaco, I) Las agallas contienen hembras ovipositoras fuente de nuevas infecciones J,K,L) Índice de agallamiento. (Agrios G. N., 1996).....8

Figura 2: *Meloidogyne*. A-F. Macho. G-K. Juvenil del segundo estadio. A. Región esofágica. B. Campo lateral. C y D. Región anterior. E. Región posterior (vista lateral). F. Región posterior (vista ventral). G y H. Región anterior. I y J. Región caudal. K. Región esofágica. St = estilete; esp = espículas (Modificado de Sasser and Carter, 1985).....10

Figura 3: A-D. Patrones perineales de *Meloidogyne incognita* (Eisenback *et al.*, 1983).....13

Figura 4: *Meloidogyne*. A. Hembra entera. B. Forma de las hembras. C. Región anterior de una hembra. D. Regiones y partes de un patrón perineal. St = estilete; m = metacorpus; bg = bulbo glandular; gc = glándulas caudales; ov = ovario; ovi = oviducto; v = vulva (Modificado de Sasser and Carter, 1985).....14

Figura 5: *Nacobbus aberrans*. A. Región esofágica de una hembra inmadura. B. Cola de una hembra. C. Cola de un macho. D-H. Fases de desarrollo de una hembra madura. st = estilete; pe = poro excretor; icl = incisuras del campo lateral; v = vulva; b = bursa; esp = espícula; f = fasmidio; h = huevecillos (Modificado de Stone y Burrows, 1985).....23

Figura 6: Representación del ciclo biológico de *N. aberrans*. A) Etapa de embriogénesis, B) Segunda etapa larvaria ataca raíces, C) J₂, J₃, J₄ y hembras jóvenes invaden la raíz como inoculo primario, D) J₂ Se alimenta de células puede salir y reinfectar la raíz formando falsos nodulos, E) Tercera etapa larvaria, F) Cuarta etapa larvaria, G) Nematodos adultos, el macho abandona la raíz, H) Hembra deposita huevos en ovisaco, I) Las agallas contienen hembras ovipositoras fuente de infecciones J, K) Índice de agallamiento.....28

Figura 7: Estructuras químicas de la quitina, quitosano y la celulosa.....	41
Figura 8: Proceso convencional para la obtención de quitina y quitosano.....	42

Capítulo II.

Figura 1: A) Lote infestado del nematodo <i>N. aberrans</i> , B) Ubicación geográfica Campus del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco estado de México, C) Selección de plantas infestadas, D) Masas de huevecillos presentes en raíces infestadas.....	72
--	----

Figura 2: A) Masas obtenidas en tamiz de 100 mallas, B) selección de masas homogéneas, C) Liberación de huevos de la matriz gelatinosa, D) Huevo aislados, E) Juveniles eclosionados F) Desinfección en una campana de flujo laminar y G) Larva de segundo estadio J ₂	74
---	----

Figura 3: A) Plántula susceptible a nematodos, B) Caja Petri como unidad experimental, C) Inoculación de nematodos J ₂ <i>N. aberrans</i> , en la unidad experimental y D) Incubación de plántulas en cámaras bioclimáticas.....	78
---	----

Figura 4: A) Hembra del nematodo <i>N. aberrans</i>	80
---	----

Capítulo III.

Figura 1: A) Lote infestado del nematodo <i>M. incognita</i> , B) Ubicación geográfica del lote infestado de la Agrícola ICAPS.A. C) Selección de plantas infestadas, raíces con suelo para evitar perdida de masas, D) Raíces con agallas, E) Masas de huevecillos presentes en raíces infestadas.....	92
---	----

Figura 2: A) Masa de huevecillos en tamiz, B) Masas homogéneas seleccionadas C) Huevos liberados del matriz gelatinoso D) huevo aislado E) Juveniles eclosionados F) Desinfección en una campana de flujo laminar y G) Larva de segundo estadio J ₂	95
--	----

Figura 3: A) Plántula CM-334 susceptible al nematodo agallador, B) Caja petri perforada para inoculación, C) Unidad experimental, D) Forma de inoculación de J ₂ en la unidad experimental, E) Bioensayo en plántula.....	99
--	----

Figura 4: A) Patron perineal de hembras del genero *Meloidogyne incognita* colectados en la zona.....100

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Ubicación de los sitios de colecta de muestras de chile infestadas con *M. incognita*....93

INTRODUCCIÓN GENERAL

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una hortaliza muy importante para la economía de nuestro país ocupando el primer lugar en producción en el estado de Sinaloa con un 23.7% en su participación a nivel nacional; además en el contexto mundial, México ocupa el segundo lugar en superficie cultivada con 71, 396 ha y el primer en cuanto a volumen y valor de la producción de \$5, 993, 646, 542.00 en el renglón hortícola con una producción destinada tanto al mercado nacional como para la exportación, donde Sinaloa alcanza una producción de 692, 632 toneladas (ASERCA, 2006 , FAO, 2006).

Su participación en la balanza agropecuaria es fundamental en la generación de divisas, ocupando el 16% del valor total de las exportaciones agropecuarias. A pesar de cultivarse en 27 estados sólo cinco concentran más del 73% en superficie sembrada, desatacando el estado de Sinaloa, como el principal productor, (60% de la producción), seguido por Baja California, San Luis Potosí, Sonora, Jalisco, Michoacán (en orden de importancia).

Durante el proceso de producción se presentan muchos factores, bióticos y abióticos que limitan su siembra y producción; entre los primeros se encuentran los agentes fitopatógenos como son: hongos, por ejemplo *Fusarium oxysporum* (Aballay y Flores, 2000), bacterias, nematodos, virus, entre otros. En el grupo de los nematodos formadores de nódulos radiculares se presentan las especies del género *Meloidogyne* y *Nacobbus aberrans* que atacan aproximadamente unas 2,000 plantas que incluyen casi todas las especies cultivadas (Agrios, 1996). Las elevadas poblaciones de estos géneros de nematodos causan pérdidas significativas dentro del territorio nacional.

Los daños varían dependiendo en gran medida de la susceptibilidad del cultivar, la densidad del inóculo, la interacción con otros parásitos, presencia y cantidad de vectores, condiciones

ambientales y el manejo que se realice en el cultivo. Se han utilizado diferentes métodos de combate de estos patógenos, siendo los nematicidas de origen químico los más efectivos, no obstante, estos productos son costosos, tienen un efecto detrimental en el ambiente y la salud humana (Dávila *et al.*, 1999); sin embargo, su uso es considerado como una alternativa para el control de nematodos fitoparásitos y aplicaciones bien dirigidas han permitido lograr incrementos significativos en el crecimiento y la producción de los cultivos (Araya y Cheves, 1997). Además de que la agricultura en México esta muy ligada a este tipo de control, su uso indiscriminado puede provocar que las poblaciones de nematodos se vuelvan tolerantes o resistentes a estos (Cristóbal, 2001; Pérez Rodríguez *et al.*, 2007)

Como alternativas al control químico se han evaluado el potencial de las enmiendas orgánicas, la rotación de cultivos, aplicación de materia orgánica (Van Der Laam, 1956, Zavaleta Mejía *et al.*, 2004) y solarización mediante el uso de acolchados de plástico (Ramírez, 1996), Muchas de estas practicas se han utilizado individualmente y combinadas en el manejo integrado de plagas (Soler Serratos *et al.*, 1996, Bastidas, 2006).

Una alternativa que se propone evaluar en el presente trabajo es el uso de quitina y quitosano como reguladores de las poblaciones de nematodos agalladores. La quitina substancia mas abundante en la naturaleza, después de la celulosa (Sandford, 1989), se encuentra formada por unidades de N-acetilglucosamina (2-acetamida, 2-desoxi- β -D-glucosa) enlazadas por uniones β (1-4). La quitina y sus derivados como el quitosano (derivado desacetilado de la quitina), tienen numerosas aplicaciones en la industria de los alimentos (Benjakul *et al.*, 2000; Shahidi *et al.*, 2001), la farmacia (Liu *et al.*, 2001), los cosméticos, las pinturas y los textiles. En la agricultura, estos productos destacan por sus propiedades antifungicas y nematicidas, porque promueven resistencia en las plantas contra fitopatógenos (Hoagland y Parris, 1996; Lafontaine y

Benhamou, 1996; Amborabe *et al.*, 2008). Las ventajas de su uso residen en ser materiales naturales, no tóxicos, biocompatibles y biodegradables (Shirai y *col.*, 1996).

Su uso, se considera una medida importante a integrar en las alternativas para el manejo de *Meloidogyne spp* y *Nacobbus aberrans*. La combinación de una o más prácticas sustentables puede tener como resultado un aumento en los efectos de cada práctica individual, además de mejorar el manejo de los organismos patógenos del suelo y aumentar la eficiencia en producción de alimentos (Johnson, 1995).

HIPÓTESIS

- La adición de quitina y quitosano tendrán un efecto regulador de poblaciones de huevecillos y fases infectivas (J₂) de *M. incognita* y *N. aberrans* reduciendo los daños en la planta hospedera.

Por lo tanto se considera que:

- La adición de dosis efectivas de quitina o quitosano *in vitro* tienen un efecto ovicida en huevos aislados o en masas de *N. aberrans* y *M. incognita*.
- La quitina y el quitosano actúan como nematocida regulando las poblaciones de la fase infectiva (J₂) de *N. aberrans* y *M. incognita*.
- Plantas tratadas con quitosano estarán libres tanto de J₂, así como del daño causado por *N. aberrans* y *M. incognita*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los biopolímeros naturales quitina y quitosano con diferentes grados de desacetilación como reguladores de nematodos formadores de nódulos radiculares *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita* *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de quitina y quitosano con diferentes grados de desacetilación sobre huevos de *N. aberrans* y *M. incognita* *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la dosis de quitina y quitosano con diferentes grados de desacetilado sobre la fase infectiva (J₂) de *N. aberrans* y *M. incognita*, *in vitro*
- Prueba *in vitro* sobre dosis de aplicación de quitosano en plántulas de chile, para regular la invasión y daños de la fase infectiva (J₂) de *N. aberrans* y *M. incognita*.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

4.1 Nematodo agallador (*Meloidogyne* spp)

4.1.1 Importancia económica

Las especies del género *Meloidogyne* constituyen los nematodos patógenos de plantas de mayor importancia económica por su amplia distribución mundial y por el gran número de hospederos que atacan (Eisenback *et al.*, 1981). Más del 5 % de pérdidas a nivel mundial están asociados a éste nematodo. En México, la reducción en la producción de algunos cultivos por este nematodo varía de 30 a 100 % (Sosa-Moss, 1985).

Meloidogyne spp., está reportado en Alemania, Suiza, Dinamarca, Holanda, Rusia, Inglaterra, Estados Unidos de América, Brasil, Argentina, Uruguay, Chile, México, etcétera. Es el nematodo que más se ha estudiado por ser el que más daños causa a cultivos de importancia económica (Marban-Mendoza, 2004). De las casi 60 especies de nematodos agalladores del género *Meloidogyne* sólo cuatro especies causan daños considerables en hortalizas, tales especies son *Meloidogyne incógnita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* (Zuckerrnan *et al.* 1994)

4.1.2 Distribución geográfica

Las partes del mundo entre los 35° de latitud sur y 35° de latitud norte están ampliamente infestadas por *M. javanica*, *M. incógnita* y *M. arenaria*. En el hemisferio norte, a más de 35° de latitud, *M. hapla* es la más común. El género *Meloidogyne* incluye cerca de 80 especies y once razas. Las especies más comunes a nivel mundial por su amplia distribución geográfica y por el gran número de plantas que parasitan son: *Meloidogyne incógnita*, razas 1, 2, 3 y 4; *M. arenaria*, razas 1 y 2; *M. javanica* y *M. hapla*, raza A y B (Guiran and Ritter, 1979; Eisenback *et al.*, 1981;

Hartman y Sasser, 1985; Jones, 1981; Sasser, 1977; Karssen y Van Hoenselaar, 1998). *Meloidogyne hapla* es una especie que existe en el Norte de Estados Unidos y Sur de Canadá, Norte de Europa y de Asia; en América del Sur se encuentra distribuida a los 40° de latitud sur en las regiones montañosas del lado occidental del continente. En África se localiza en altitudes mayores a 1500 msnm; en Australia es común en Victoria (Taylor y Sasser, 1983).

M. javanica es una especie común en zonas cálidas. En Norteamérica y América del Sur, *M. javanica* se encuentra muy escasamente sobre los 30° de latitud norte y 35° de latitud sur y se va haciendo más común a medida que se va aproximando al Ecuador. En muchas partes de la zona cálida de África, Australia, y Sur de Asia, probablemente *M. javanica* es la especie más común. *M. incógnita* y *M. arenaria* son comunes y se encuentran distribuidas en las mismas regiones.

En México, el nematodo agallador se ha reportado en áreas agrícolas en Baja California, Sonora, Coahuila, Sinaloa, Durango, San Luis Potosí, Nuevo León, Tamaulipas, Nayarit, Michoacán, Tlaxcala, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Puebla, Hidalgo, Morelos, Estado de México, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Chiapas y Tabasco, (Castro *et al.*, 1990; Cid del Prado *et al.*, 2001; Montes, 1988; Carrilo-Fasio *et al.*, 2000).

4.1.3 Clasificación taxonómica del genero *Meloidogyne* spp.

Phyllum	Nemata
Clase	Secernentea
Subclase	Diplogasteria
Orden	Tylenchida
Suborden	Tylenchina
Superfamilia	Tylenchoidea

Familia	Heteroderidae
Subfamilia	Meloidogyninae
Genero	<i>Meloidogyne</i>

4.1.4 Ciclo de vida

El ciclo de vida de todas las especies de *Meloidogyne* es esencialmente el mismo, sin embargo, algunos autores indican que el tipo de hospedero y condiciones ambientales como luminosidad, temperatura, altitud, pH, textura del suelo, etc., hacen que varíe el ciclo de vida de estos nematodos (Cepeda, 1996).

La duración del ciclo de vida de *Meioidogyne* spp., es de 3 a 4 semanas en hospederas susceptibles presentes en suelos ligeros con temperaturas que oscilan entre los 25 y 30°C, y puede presentarse 3 a 10 generaciones por año (Dropkin, 1980). Su ciclo biológico inicia con el huevo, posteriormente pasa por cuatro estados larvales para convertirse en adulto (Bird, 1979).

El huevo es depositado por una hembra parcial o totalmente incrustada en la raíz de la planta hospedera, en una masa gelatinosa que los mantiene agregados en ésta o en sacos, en los que han encontrado hasta mil huevos en una misma masa, que puede ser más, grande que el cuerpo de la hembra. El desarrollo del huevo inicia pocas horas después de la ovoposición dando como resultado 2, 4, 8 o más células, hasta que se desarrolla una larva, la cual presenta un estilete enrollado en la membrana del huevo. Este primer estadio larval se puede mover dentro del huevo pero no es muy activo. La primera muda tiene lugar en el huevo, y no es difícil ver separada la cutícula del primer estadio, sobresaliendo más allá de la cabeza del segundo estadio larval. Poco después, la larva en segundo estadio (J2) emerge a través de un agujero hecho en un extremo del huevo, el cual perfora por medio de pinchazos repetidos con el estilete, cuando ya está completamente desarrollado con temperatura y humedad favorables éste puede dejar o no

inmediatamente la masa mucilaginosa. Generalmente se encuentran varias larvas emergidas en la masa de huevos junto con huevos en varios estados de desarrollo. (Fig.1)

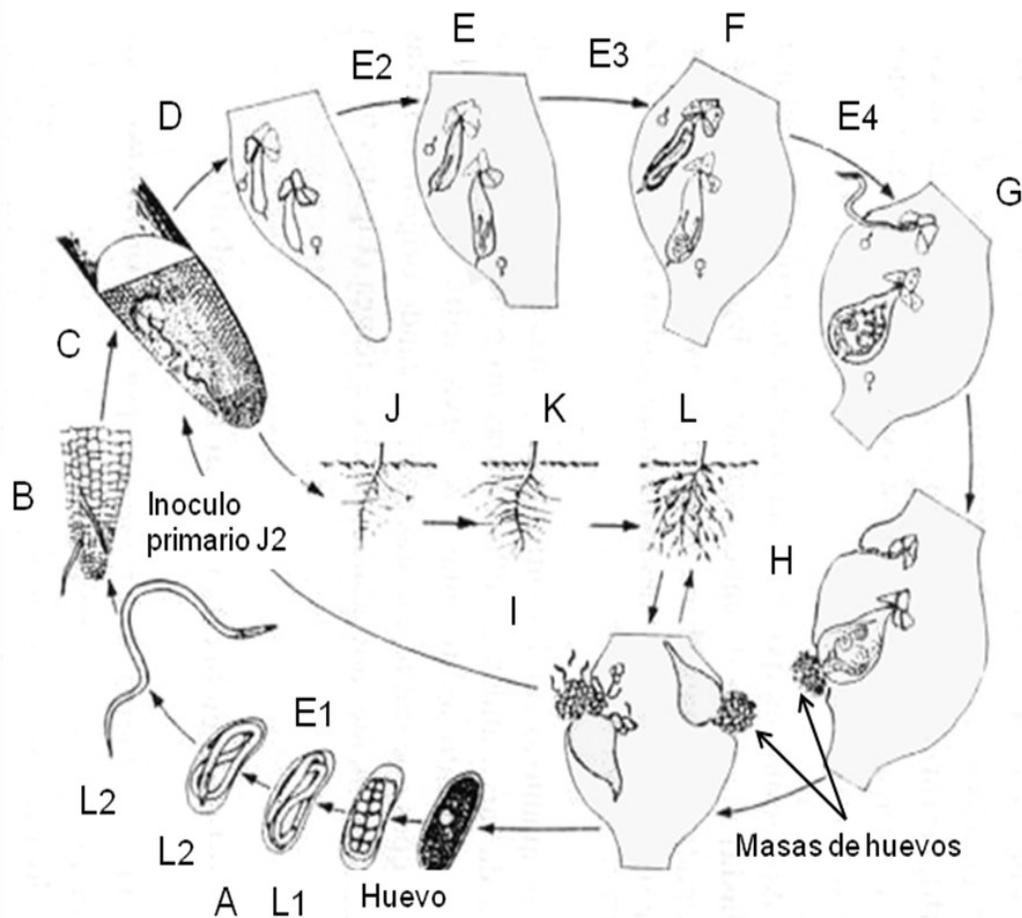


Figura 1: A) Etapa de embriogénesis, B) Segunda etapa larvaria ataca raíces, C) J₂ invade la raíz y forma células gigantes, D) J₂ se alimenta de células gigantes y comienza a formar agallas, E) Tercera etapa larvaria, F) Cuarta etapa larvaria, G) Nematodos adultos, el macho abandona la raíz, H) Hembra deposita huevos en ovisaco, I) Las agallas contienen hembras ovipositoras fuente de nuevas infecciones J,K,L) Índice de agallamiento, tomado de (Agrios G. N., 1996).

Cuando se desprenden dos cutículas se considera que se ha completado la segunda y tercera muda en la hembra, en esta fase el estilete y el bulbo esofágico medio desaparecen. Poco después de la cuarta muda el estilete y el bulbo medio son regenerados, se forma la vagina y el patrón perineal se hace visible. Se forman dos gónadas femeninas, que se alargan y se doblan en el

cuerpo, casi globular o ligeramente alargado con un cuello que puede ser corto y robusto (Bird, 1979; Taylor y Sasser, 1983).

Los machos son escasos, generalmente presentan una gonada y cuando llegan a presentar dos se debe a que se han desarrollado a partir de una larva hembra, esta situación se presenta cuando las condiciones ambientales son desfavorables, y se incrementa la cantidad de estos (Hirschmann citado por Bird, 1979; Papadopoulou y Triantaphyllou, 1982). Presentan poro excretor, la estructura del bulbo medio del esófago y el estilete robusto (Franklin, 1979; Hirschmann, 1982; Page, 1985; Goeldi citado por Jepson 1987).

Los machos son alargados y vermiformes con la cola redondeada, presentan una espícula y un gubemáculo muy notorios, este estado sexual no es útil en general para la identificación, no se les encuentra asociados con la hembra y en general su ciclo de vida es muy corto, eclosionan cuando están completamente desarrollados y éstos no se alimentan (Fig.2) (Bonnemaison, 1975; Franklin, 1979; Dropkin, 1980; Hirschmann, 1982; Page, 1985; Eisenback y Triantaphyllou, 1991).

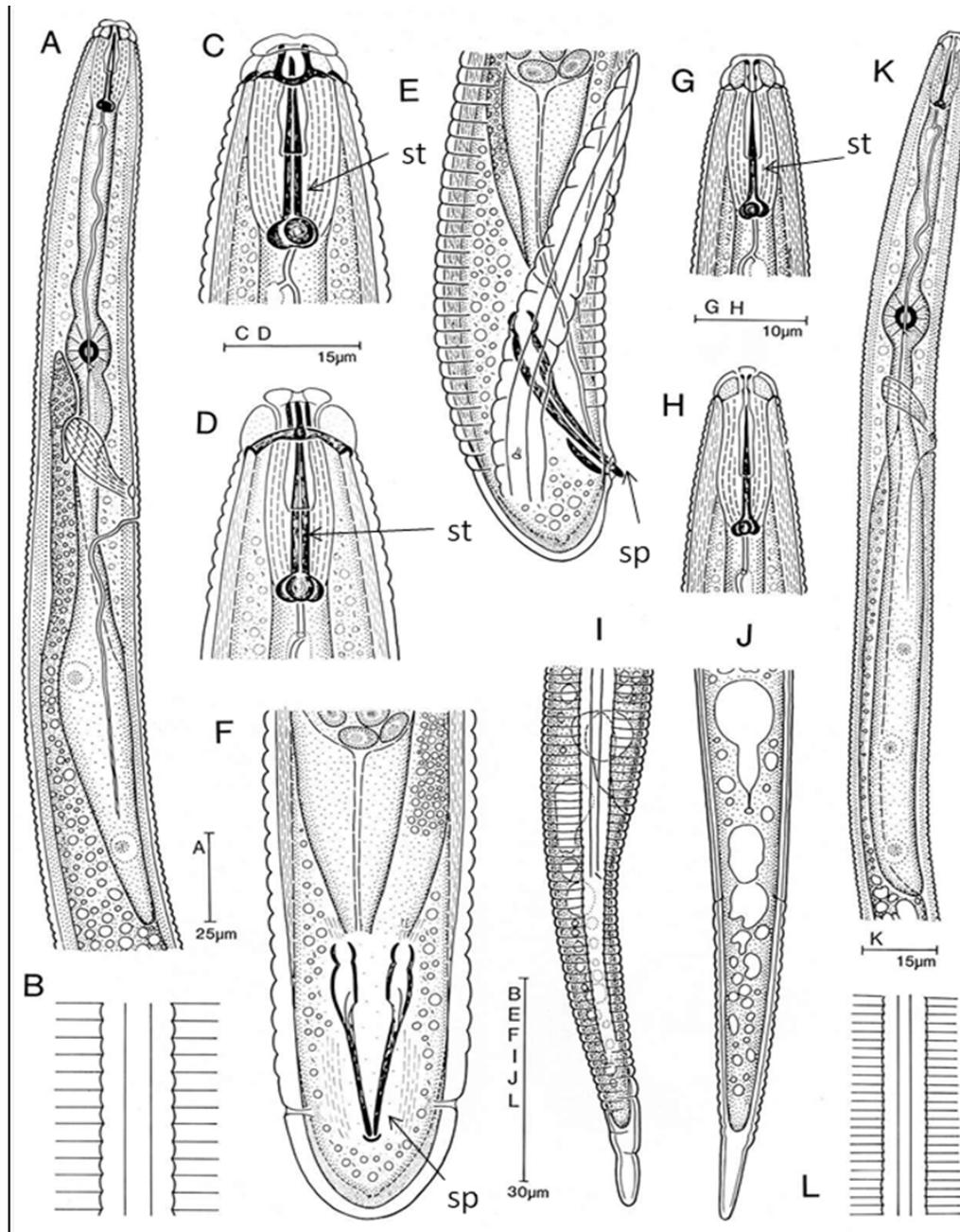


Figura 2: *Meloidogyne*. A-F. Macho. G-K. Juvenil del segundo estadio. A. Región esofágica. B. Campo lateral. C y D. Región anterior. E. Región posterior (vista lateral). F. Región posterior (vista ventral). G y H. Región anterior. I y J. Región caudal. K. Región esofágica. St = estilete; esp = espículas, tomado de (Eisenback *et al.*, 1981).

Los machos poseen una cabeza como cápsula, ésta incluye un disco labial rodeado por labios laterales y labios medios, un prestoma localizado en la parte central del corte del estoma, cuatro órganos sensoriales terminan en los labios medios (sensilas cefálicas) y otras seis alrededor del

estoma (sensilas labiales); el tamaño y forma del cono del estilete, hueco y grosor, son características importantes para la identificación de las especies (Eisenback *et al.*, 1981).

Los machos, hembras y larvas poseen un estilete que consta de una punta cónica, una columna recta y tres nódulos. El estilete es retráctil, debido a unos músculos que están adheridos a los nódulos, poseen una abertura cerca de la punta que conduce al lumen el cual es continuación con el lumen del esófago adherido a los nódulos, cerca de la parte posterior de los nódulos el lumen tiene una ramificación corta llamada orificio de la glándula dorsal, el lumen esofágico conduce hacia una válvula situada en el bulbo esofágico medio.

Los músculos adheridos a la válvula se encargan de dilatarla y contraerla para trasladar el alimento al intestino, en este mecanismo también contribuyen tres válvulas, una dorsal y dos sub-ventrales que se encuentran posteriores al bulbo medio. El conducto de la glándula dorsal se dirige hacia un orificio que se encuentra en la misma válvula y los conductos de las glándulas sub-ventrales desembocan dentro del tubo esofágico en el bulbo medio.

Cuando el nematodo se alimenta, incrusta la punta del estilete dentro de la célula de la planta, las secreciones de la glándula dorsal esofágico fluyen a través de la abertura del estilete hacia el interior de la célula de la planta, los juveniles y las hembras tienen glándulas esofágicas bien desarrolladas y las usan en su alimentación. Los machos al parecer no se alimentan y carecen de glándulas esofágicas bien desarrolladas.

Los nematodos del género *Meloidogyne* presentan dimorfismo sexual. Las hembras son esféricas y la longitud promedio fluctúa alrededor de 0.44 a 1.3 mm y el ancho promedio entre 0.325 y 0.7 mm. Su cuello es usualmente corto o algunas veces muy largo. La región labial es ancha y está conformada por seis labios, los submedios se encuentran fusionados en forma simétrica o asimétrica. El estilete es robusto, con el cono generalmente curvado hacia la parte dorsal en la

parte media, de 10-25 μm de longitud y tres nódulos basales la morfología del esófago en machos, juveniles y hembras es básicamente la misma, sin embargo en las hembras parece estar degenerado funcionalmente; en esta el lumen es delgado y los músculos radiales del metacorpus son escasos pobremente desarrollados y desorganizados (Guiran y Ritter, 1979; Eisenback, 1985; Eisenback y Triantaphyllou, 1991). Posterior al bulbo medio hay tres glándulas, una dorsal y dos subventrales. La desembocadura de la glándula dorsal se localiza detrás de los nódulos del estilete a 2-8 μm y las dos glándulas subventrales lo hacen en el bulbo medio (Guiran y Ritter, 1979). La cutícula presenta anulaciones finas y estriaciones terminales formando el patrón perineal alrededor de la vulva y ano; el patrón perineal es el rasgo más característico de las hembras de la mayoría de las especies de *Meloidogyne* (Fig.3). Esta área comprende el término de la cola, fasmidias, líneas laterales, ano y vulva, rodeados por pliegues cuticulares o estrías. El diseño perineal de individuos y poblaciones dentro de una especie varia, pero las características incluyen la forma del diseño perineal (circular, oval, piriforme o de reloj de arena); la presencia o ausencia de marcas en las áreas laterales y de puntuaciones en el final de la cola; la forma de las estrías (lisas, enteras, onduladas, quebradizas, zig-zag); y si las estrías forman alas en uno o ambos lados del diseño (Magunacelaya y Dagnino, 1999).

Los huevos son depositados dentro de una matriz gelatinosa, producida por las células de las glándulas rectales antes y durante la producción de los huevos y es secretada a través del ano. La matriz gelatinosa contiene proteínas, carbohidratos y enzimas (Eisenback, 1985; Eisenback y Triantaphyllou, 1991) (Fig.4).

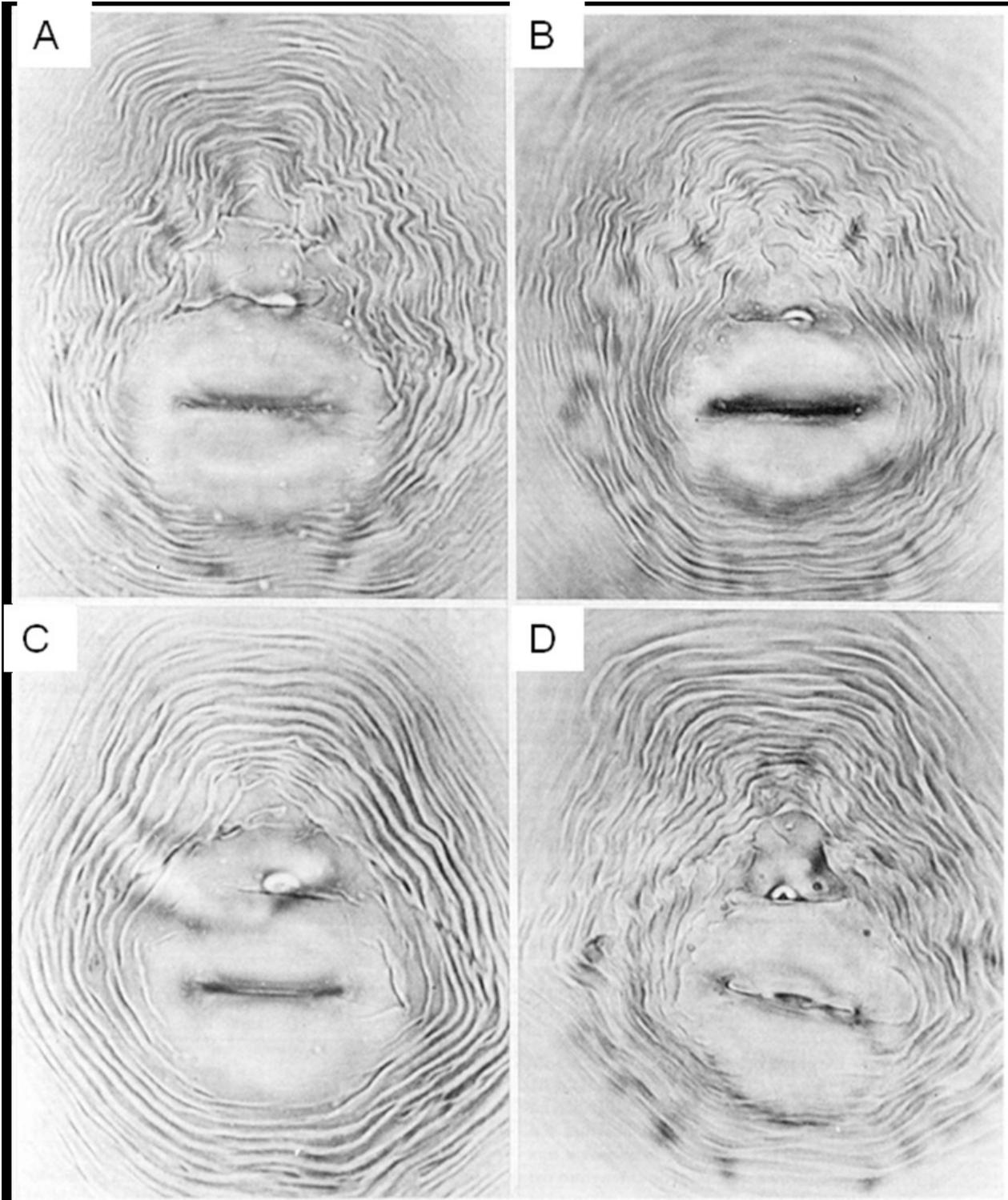


Figura 3: A-D. Patrones perineales de *Meloidogyne incognita*, tomado de (Eisenback *et al.*, 1983).

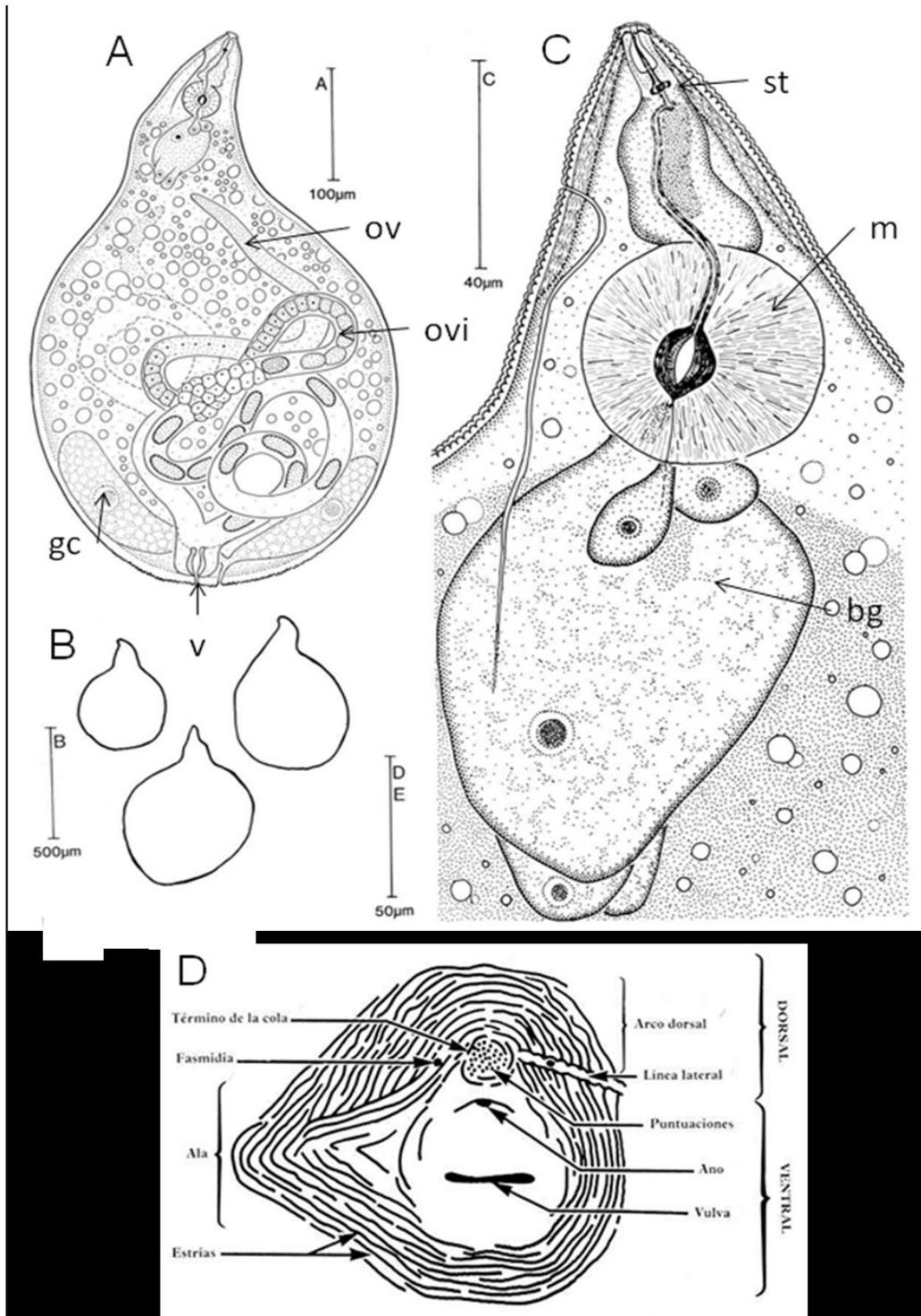


Figura 4: *Meloidogyne*. A) Hembra entera. B. Forma de las hembras. C) Región anterior de una hembra. D) Regiones y partes de un patrón perineal. St = estilete; m = metacarpus; bg = bulbo glandular; gc = glándulas caudales; ov = ovario; ovi = oviducto; v = vulva, tomado de (Eisenback *et al.*, 1981).

En muchos de los casos los machos no son necesarios para la reproducción por lo que varias especies de *Meloidogyne* se reproducen por fecundación cruzada o partenogénesis meiótica facultativa en poblaciones sin partenogénesis aseguran una diversidad genética por recombinación, ya que la reproducción de machos en poblaciones que se reproducen por partenogénesis meiotica es un mecanismo de sobrevivencia cuando las plantas están bajo stress, se sabe que los juveniles desarrollan mayor numero de machos que de hembras, y dado que estos no se alimentan, bajo estas condiciones la presión sobre la planta con stress se reduce (Magunacelaya y Dagnino, 1999).

4.1.5 Sintomatología

Los síntomas del ataque de nemátodos fitoparásitos en la parte aérea de las plantas no son típicos, y pueden confundirse con los provocados por el ataque de otros organismos tales como insectos, hongos, bacterias, virus y aún por deficiencias nutricionales. Afortunadamente, para el caso de nemátodos formadores de agallas de raíces, el problema se facilita porque en la mayoría de sus hospederas forman agallas que le dan un aspecto muy característico a la raíz. Es por ello que se debe desarrollar el hábito de observar las raíces de las plantas que muestran dichas características (Palacios, 1970).

No obstante, los síntomas característicos de *Meloidogyne* spp., se aprecian en los órganos subterráneos de los vegetales, donde causan agallas, las cuales tienen un diámetro de dos a tres veces mayor al de las raíces sanas, pueden existir lesiones, manchas necróticas y/o zonas podridas (Marbán-Mendoza, 2004).

Las especies de *Meloidogyne*, además de causar la formación de células gigantes y agallas, provocan necrosis en raíces y tubérculos altamente infestados, acortamiento y disminución de raíces laterales y escasos pelos radicales; al romperse los elementos vasculares en las

agallas, se interrumpe en forma mecánica el flujo de agua y nutrientes. Fisiológicamente el ataque por estos nematodos aumenta la producción de proteínas en las agallas y provocan un mal funcionamiento de los reguladores de crecimiento entre las raíces y el tallo. Estos cambios contribuyen a la reducción del crecimiento y desarrollo de las plantas (Cepeda, 1996), lo cual se ve incrementado por la interacción de estos nematodos con otros microorganismos fitopatógenos como los hongos (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Curvularia* y la bacteria *Pseudomonas agrobacterium*) (Siddiqi, 1986; Porter y Powell, 1967).

4.1.6 Hospederos

En México, el nematodo agallador se ha reportado en Baja California, Sonora, Coahuila, Sinaloa, Durango, San Luis Potosí, Nuevo León, Tamaulipas, Nayarit, Michoacán, Tlaxacala, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Puebla, Hidalgo, Morelos, Estado de México, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Chiapas y Tabasco, (Castro et al., 1990; Cid del Prado *et al.*, 2001; Montes, 1988; Carrillo-Fasio *et al.*, 2000). Entre los cultivos que parasita de manera importante en México sobresalen: jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), chile (*Capsicum annum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.), maíz (*Zea mays* L.), sandía (*Citrullus vulgaris*), papa (*Solanum tuberosum* L.), café (*Coffea arabica*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), fresa (*Fragaria chiloensis*), cebolla (*Allium cepa* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), alfalfa (*Medicago sativa*), durazno (*Prunus pérsica* L.) y vid (*Vitis vinífera*), (Carrillo-Fasio *et al.*, 2000; Cid del Prado *et al.*, 2001; Guzman-Plazola *et al.*, 2006). Cepeda (1996) además reporta al: aguacate, algodón, amaranto, cacahuete, col, garbanzo, guayabo, manzano, melón, papaya, quelite, en los estados de Guanajuato, Michoacán, Guerrero,

Oaxaca, Veracruz, Sonora, Sinaloa, México, Puebla, Tlaxcala, Coahuila, Durango, Nuevo León, Chiapas y Baja California.

4.1.7 Métodos de control

En las últimas décadas se han venido realizando diferentes trabajos para el control de *Meloidogyne* alrededor del mundo, con diferentes métodos que incluyen desde el desarrollo de variedades resistentes, hasta la aplicación de productos químicos, biológicos y orgánicos.

4.1.7.1 Cultural

Las practicas culturales como el barbecho, inundaciones, aplicación de abonos orgánicos, cultivos de plantas de cobertura y rotación de cultivos entre otras, reducen las poblaciones de nematodos parásitos de plantas cultivadas. Generalmente, estas prácticas provocan condiciones adversas para los nematodos, por lo que la capacidad de estos para sobrevivir, multiplicarse y producir enfermedades se afecta notablemente (Cepeda, 1996). El uso de materia orgánica como enmiendas de suelo es una buena estrategia para el manejo de *Meloidogyne* spp., y otros nematodos fitoparásitos (Mían *et al*, 1982).

En trabajos realizados por Zavaleta-Mejía *et al.*, (1990), comprobaron que la incorporación de col en el suelo era benéfico para el tomate, ya que los resultados obtenidos indicaron que las plantas de la familia Brassicaceae producen glucosinalatos que al hidrolizarse, pueden formar gases volátiles como isotiocianatos, sulfuros, disulfuros, trisulfuros y mercaptanos estos compuestos afectan la inactivación del 75 % a 100 % de larvas de *M. incógnita*.

El control de nematodos con el uso de la gallinaza tiene un efecto directo en la cantidad de estiércol incorporado al suelo. Badra *et al.*, (1979), citados por (Mian y Kábana 1982), reportaron que los ácidos grasos, fenoles, gases, etc., producidos durante la descomposición de la gallinaza tienen efectos nematicidas. La gallinaza, al ser

incorporado en suelos infestados por fitonematodos no solo produce incrementos en altura en las plantas, materia seca y peso de raíz, si no que también induce una mejoría en el rendimiento, (Ruelo 1983).

4.1.7.2 Biológico

Este tipo de control es una de las alternativas más efectivas e inofensivas al medio ambiente. Existen diferentes agentes biológicos entre ellos algunos hongos que pueden limitar el incremento poblacional de los nematodos (Lara *et al.*, 1996). Zavaleta-Mejía y Van Gundi (1986), inocularon 326 bacterias y 28 actinomycetes a plantas de tomate y pepino previamente inoculados con *Meloidogyne incógnita* y obtuvieron como resultado que el 31 % y 23 % de los aislamientos bacterianos, así como el 69 % de los actinomycetes provocaron un decremento de por lo menos el 10 % del índice de agallamiento y un incremento en el peso seco de la parte aérea en las plantas de tomate y pepino.

Yue *et al.*, (1997), sugieren que la aplicación de extractos alcalinos del alga café (*Ascophyllum nodosum*) en el suelo cerca de las raíces de tomate, reduce significativamente el número de juveniles (J2) y la cantidad de huevecillos extraídos de las plantas tanto de *M. javanica* como de *M. incógnita*.

Rao *et al.*, (1997), encontraron que *Trichoderma harzianum* y la pasta de Neem (*Azadirachta indica*), solos o combinados, incorporados al suelo como manejo contra *M. incógnita* en plantas de tomate. Los resultados obtenidos mostraron un incremento en el crecimiento de las plantas, así como una reducción del índice de agallamiento y un decremento de las poblaciones finales de *M. incógnita*. También observo un incremento en la colonización de *Trichoderma harzianum* en las raíces de tomate, lo cual indica un efecto favorable de la enmienda de pasta Neem en el crecimiento de *Trichoderma harzianum*.

Marban *et al.*, (1992) mostraron que el hongo *Paecilomyces marquandii* en suelos con un sistema de cultivo en chinampas mostraron que el hongo ejerció un control sobre el desarrollo de los nematodos. Abd *et al.*, (1993) en condiciones de laboratorio observaron que la mezcla de dos de los hongos biocontroladores *P. lilacinus*, *Trichoderma harzianum* o *Epicoccum* spp. redujeron el porcentaje de huevos y la actividad larval de *Meloidogyne incognita*. Con extractos de algas marinas *Ascophyllum nodosum* aplicadas a plantas de tomate variedad Ailsa Caraig redujeron la cantidad de huevos extraídos en comparación con el testigo (Whapam *et al.*, 1994). Rojas y Marbán (1999) probaron la adherencia y parasitismo de la bacteria *Pasteuria penetrans* en *M. incognita* y *M. arabicida* y de acuerdo a sus resultados suponen que la bacteria es más específica para *M. incognita* y concluyeron que *P. penetrans* puede ser considerado como un nematocida biológico.

Siddiqui and Shaukat (2003) encontraron que las razas CHAO-Rif/pME3424 y CHA89 derivados genéticamente de *Pseudomonas fluorescens* raza CHAO, en bajas densidades de población de *Meloidogyne javanica* (0, 500, 1000 y 2000 J₂ por maceta) ambas razas redujeron significativamente la penetración de nematodos en raíces de las plantas y a densidad alta de población de nematodos (4000 J₂/maceta) solo la raza CHAO-Rif/pME3424 redujo significativamente la penetración en el mismo cultivo.

Gotlieb *et al.*, (2003) descubrieron que la incorporación del micelio seco de *Penicillium chrysogenum* producto de desecho de una industria farmacéutica aumento el crecimiento y redujo el índice de agallamiento causado por *M. javanica* en plantas de tomate y pepino.

Chubachi *et al.*, (2003) evaluaron el efecto nematocida de seis diferentes razas de *Streptomyces* sp. Contra juveniles (J₂) de *Meloidogyne incognita* raza 1. Inocularon plántulas de pepino con cada una de ellas en macetas y encontraron que incrementó la longitud, el peso fresco y las razas

NA-494 y NA-369 disminuyeron el índice de agallamiento en un 24 y 29% respectivamente comparadas con el testigo. Y las razas NA-150 y NA-359 redujeron casi en un 50% la densidad de población de juveniles.

4.1.7.3 Químico

Actualmente, la alternativa de control de patógenos más utilizada es el uso de productos químicos-sintéticos; algunos de estos productos son de acción dual y son activos contra nematodos y también insectos (Agrios, 1997). Se han realizado varios estudios para observar la eficacia de estos productos, al respecto Román *et al.* (1976) evaluaron la eficacia de varios nematicidas en el control de nematodos en plátano, encontraron que fenamiphos, carbofuran, oxamil, aldicarb y ethoprop, protegen las plantas del ataque del nematodo o evitan la reducción en el rendimiento utilizados adecuadamente. Estos resultados fueron corroborados por Chavarría e Irizarry, (1997) quienes reportaron efectos similares a dosis más bajas que las recomendadas en la etiqueta, a intervalos de cuatro meses. En otro trabajo Marroquín (1980), encontró que el tratamiento de la semilla de frijol con oxamyl controló a los nematodos 30 días después de haber emergido las plantas. Así mismo, Townshend y Chiba (1987) señalan que la inmersión de semilla de alfalfa en una solución que contenía Oxamil indujo un mejor desarrollo de las plantas y redujo significativamente la población de *Pratylenchus* y el grado de agallamiento radical por *M. hapla*. De igual forma, en otra investigación en pepino se encontró que la inmersión de la semilla en soluciones de oxamyl, resultó ser una medida práctica que contribuyó en reducir las poblaciones de *Meloidogyne* en la primera etapa de la planta (Godoy *et al.*, 2000b). También el tratamiento de la semilla de maíz con oxamyl, disminuyó la población de nematodos durante los primeros dos meses después de la siembra, además, incremento el peso seco de la parte aérea de la planta y la producción (De Santiago, 1985). Gray y Soh (1989) señalan que la inmersión de

semillas de alfalfa en diferentes soluciones con 0.5 % carbofuran, fenamifos y oxarnil, obtuvieron un menor daño a consecuencia de *Dytilenchus dipsaci*.

El otro experimento se realizó inmersión de semillas de calabaza en soluciones con distintas concentraciones de oxamil (O, 52 000, 104 000, 156 000 y 208 000 ppm), fue evidente una mayor cantidad de larvas de *Meloidogyne* (80) en las plantas que no recibieron oxamil, en tanto, donde se aplicaron 52 000 ppm de oxamil la cantidad de larvas disminuyó a 35; no obstante la efectividad de este tratamiento fue-significativamente inferior a los de 104 000, 156 000 y 208 000-ppm, debido a que las cantidades de larvas encontradas fueron de 13.3, 6.6 y 2.2 respectivamente (Godoy *et al.*, 2000^a). Un estudio realizado en caña de azúcar mostró que la aplicación de aldicarb 150 G 12 kg/ha; carbofuran 100 G 22 kg/ha; terbufos 150 G 17 kg/ha, en un suelo infestado por *Pratylenchus zae* incrementó la producción en 8.6 t/ha (Dinardo-Miranda *et al.*, 2004). Anaya *et al.*, (2001), encontraron que con la aplicación de oxamil (Vydate L 24, 5 ml/L), incorporado al sustrato en dosis proporcionales a su volumen, indujeron una disminución (P<0.05) en la cantidad de juveniles en el suelo y de agallas formadas por *M. incógnita* en las raíces de tomate.

4.2 El nematodo falso nodulador (*Nacobbus aberrans*)

Thorne en 1935, describió la primera especie a la que le dio el nombre de *Anguillulina aberrans* a partir de muestras colectadas de plantas nativas de *Atriplex confertifolia* en las laderas desérticas del lago Utah en Estados Unidos. Después Thorne & Allen en 1944 proponen el género *Nacobbus* designado a *Nacobbus dorsalis* del Sur de California como especie tipo incluyendo además a *Anguillulina aberrans* dentro del género. En 1956 Thorne y Schuster, describieron una nueva especie, *Nacobbus batatiformis*, colectadas de remolacha azucarera provenientes de Mitchel, Nebraska, (Jatala, 1985).

Franklin (1959) descubrió que en Europa se encuentra una nueva especie de *Nacobbus* en raíces de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mili.) que crecía en invernadero en Inglaterra y la denominó *N. serendipiticus*. Hasta el año 1970 se habían descrito 4 especies del género *Nacobbus* (*N. serendipiticus*, *N. batatiformis*, *N. dorsalis*, *N. aberrans*). Sin embargo, Sher (1970) realizó una revisión del género, dejando solo dos especies, *N. dorsalis* y *N. aberrans*, y hace mención que estas dos especies son fáciles de distinguir por las siguientes características:

N. dorsalis, es un nematodo que se identifica por el número de las anulaciones que varía de 8 a 14 entre la vulva y el ano; esto se observa mejor en las hembras inmaduras, la posición de la vulva en las hembras inmaduras es de 94-97% y el cuerpo casi esférico; la hembra madura posee una elongación en la región posterior y está llena de huevecillos, usualmente contiene los juveniles, (Franklin, 1959) citado por Manzanilla, L. *et al.*, 1999.

N. aberrans, por su parte presenta de 15 a 24 anulaciones entre la vulva y el ano (Fig. 3); la hembra madura tiene forma de huso y deposita los huevecillos en una masa gelatinosa, (Franklin, 1959), citado por Manzanilla, L, *et al.*, 1999.

4.2.1 Diagnosis

El género *Nacobbus* se distingue de otros miembros del orden Tylenchida, en que las hembras son obesas, con una sola gónada y glándulas esofágicas sobrepuestas dorsalmente al intestino; los machos son filiformes y con alas caudales terminales mostrando así un marcado dimorfismo sexual (Manzanilla-López, *et al.*, 2002). Las hembras maduras (en forma de huso o globosa), se desarrollan después de cuatro estadios juveniles y uno adulto joven y vermiforme, el cual es migratorio en suelo y raíces (Manzanilla-López, *et al.*, 2002) (Fig.5). Los juveniles del tercer y cuarto estadio (J3 y J4), se encuentran enrollados en el interior de las raíces y son relativamente inactivos a diferencia de los juveniles del segundo estadio (J2), los cuales son migratorios y

activos. La hembra madura es sedentaria e induce un sitio especializado de alimentación (sincitio) en los tejidos de la raíz. Para depositar sus huevos, la hembra deposita los huevos en una matriz gelatinosa, misma que a su vez sirve para atraer a los machos, asegurando la fecundación (Inserra, 1985; Manzanilla *et al.*, 2002).

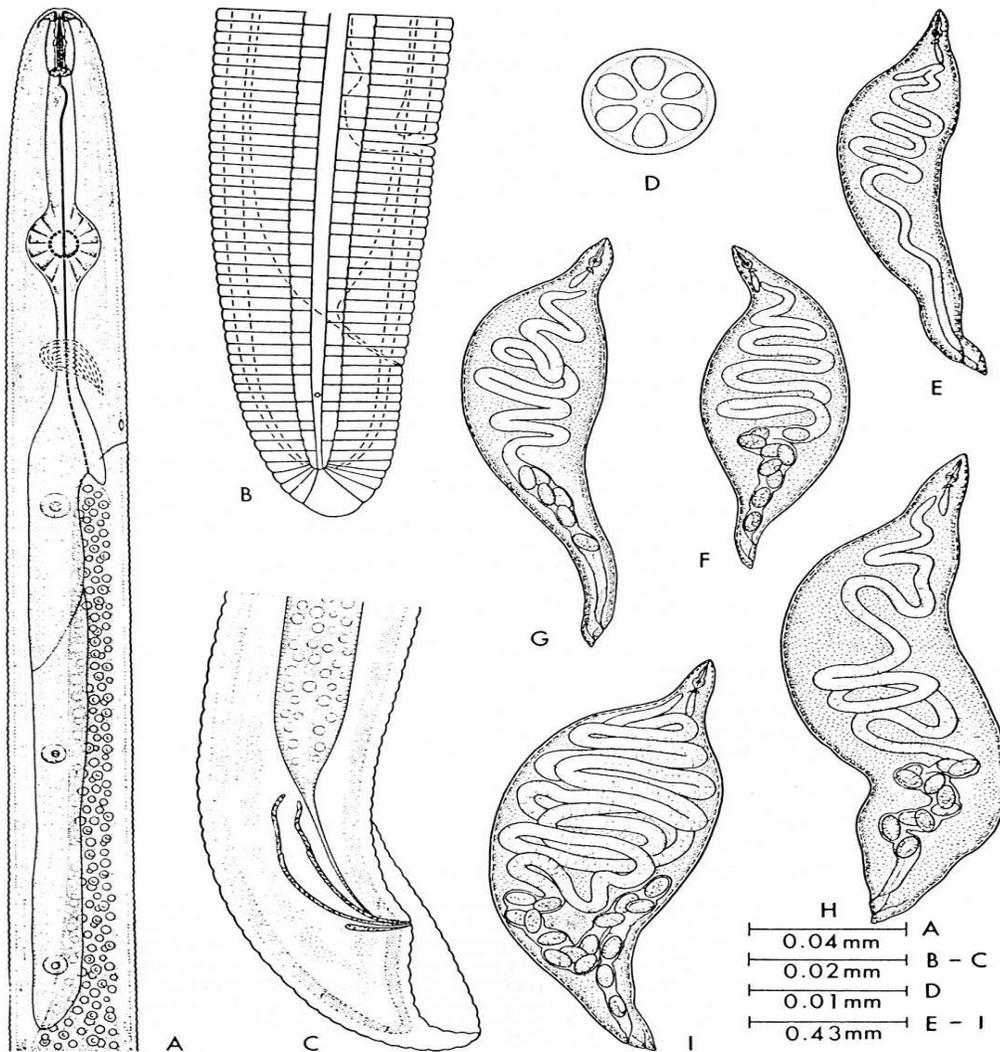


Figura 5: *Nacobbus aberrans*. A. Región esofágica de una hembra inmadura. B. Cola de una hembra. C. Cola de un macho. D-H. Fases de desarrollo de una hembra madura. st = estilete; pe = poro excretor; icl = incisuras del campo lateral; v = vulva; b = bursa; esp = espícula; f = fasmidio; h = huevecillos, tomado de (Eisenback *et al.*, 1981).

4.2.2 Importancia Económica

La importancia de este nematodo falso nodulador radica en que posee una alta capacidad reproductiva y un amplio rango de hospedantes, que lo convierten en una plaga importante y difícil de controlar, ya que en condiciones ambientales adecuadas una hembra tiene la capacidad de producir cientos de huevecillos (Manzanilla-López, 1997). Produciendo además una enfermedad conocida como jicamilla en los cultivos más importantes del estado de Puebla como lo son el chile, tomate y frijol en Zacatecas.

En México, Zamudio (1987) reporto en tomate una intensidad de daño del 50-100%, así mismo las pérdidas estimadas que ocasiona en el tomate son del 50 al 70% en Tecamachalco, Puebla (Cid del Prado *et al*, 1997). En Argentina y Sur de Perú disminuye el rendimiento en el cultivo de papa en un 90% en parcelas altamente infestadas (Costilla, 1985) y se le encuentra distribuido desde nivel del mar hasta los 4000 msnm,

Hernández *et al.*, 1992, determinaron que *N. aberrans* provoca el rompimiento de la resistencia a *Phytophthora capsici* en el cultivo de chile entre los materiales resistentes a este hongo se encuentran los genotipos Ancho-226 y Ancho-227.

4.2.3 Distribución Geográfica

De acuerdo a la información recabada y publicada recientemente por Manzanilla-López *et al* (2002), *N. aberrans* ha sido encontrado asociado a numerosos cultivos y plantas nativas en áreas templadas y subtropicales de América del Norte y Sud-América. En Norteamérica, ha sido reportado en USA y México. En los Estados Unidos ataca a la remolacha azucarera, otros cultivos hortícolas y diversas malezas hospederas; esta localizado en los estados del centro y Noreste, específicamente en Arkansas, Colorado, Kansas, Montana, Nebraska, Sur de Dakota, Utah y Wyoming (Caveness, 1959 citado por Robbins, 1982).

Jatala, (1985c), menciona que *N. aberrans* se encuentra distribuido en América del Norte, en los Estados Unidos y México. En América del sur se encuentra en Argentina, Bolivia, Ecuador, Perú y Chile y en Asia únicamente se reporta en la India. Franklin, (1959) por su parte menciona que *N. aberrans* se encuentra en Europa distribuido en el Reino Unido afectando seriamente al cultivo del tomate.

En México, *N. aberrans* se localiza en los estados de Oaxaca, Coahuila, Estado de México, Hidalgo, Morelos, Puebla, San Luis Potosí, Guanajuato, Zacatecas y Tlaxcala (Cid del Prado 1993). Se encuentra asociado principalmente a los cultivos de chile (*Capsicum annum* L.), tomate (*Lycopersicum escidentum* Mill.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

4.2.4 Clasificación Taxonómica del genero *Nacobbus aberrans*

Reino.....Animal
Phylum.....Nematoda
Clase.....Secernentea
Orden.....Tylenchida
Suborden.....Tylenchina
Familia.....Pratylenchidae
Subfamilia.....Nacobbinae
Género.....*Nacobbus*
Especie.....*aberrans*

4.2.5 Ciclo de vida

De acuerdo con Thorne y Schuster (1956), citado por Clark en 1967, dicen que el ciclo empieza cuando las hembras secretan la matriz gelatinosa y ponen los huevos en ella. Después de

completar su desarrollo embrionario, el primer estadio juvenil (J_1) muda dentro del huevo y eclosiona como segundo estadio juvenil (J_2), el cual penetra a la raíz donde puede permanecer, salir y reinfectar a la raíz. El J_2 muda en la raíz al tercer estadio juvenil (J_3), el cual es menos activo y se localiza frecuentemente enrollado en la corteza de la raíz. La muda del cuarto estadio juvenil femenino (J_4) ocurre en la corteza, después de la cual las hembras inmaduras vermiformes se establecen cerca del cilindro vascular induciendo la formación de agallas radicales, dentro de las cuales se localizan las hembras endoparásitas sedentarias que producen los huevos y los depositan hacia la superficie de la raíz a través de un pequeño canal (Clark, 1967). Se considera que los machos migran en la raíz para localizar a las hembras y fertilizarlas (Manzanilla-López, *et al.*, 1997).

A la fecha, se han intentado diversas estrategias y tácticas para su control, con el objetivo de disminuir pérdidas en los diferentes cultivos que afecta (Brunner, 1967; Cid del Prado *et al.*, 1996; Cristóbal *et al.*, 2000). Sin embargo, el manejo de *N. aberrans* sigue siendo insatisfactorio, debido a la falta de información relacionada con su ciclo biológico, estadios de sobrevivencia en el suelo y métodos de diagnósticos rápidos y confiables para su detección en muestras de suelo. Al parecer esto último a limitado en mayor medida su control, ya que este patógeno puede encontrarse en el suelo en un estado de reposo y el número de estadios activos y viables; lo que dificulta la posibilidad de establecer niveles poblacionales iniciales antes de establecer las siembras o trasplantes de cultivos susceptibles, los J_3 y J_4 sobrevivieron durante 12 meses a las condiciones experimentales expuestas, ya que conservaron su infectividad al ser inoculadas en raíces de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Río Grande. Lo anterior sugiere que estos J_3 y J_4 son protegidos por residuos vegetales y tienden a mantener su infectividad, cuando son expuestos a condiciones desfavorables del ambiente en ausencia de un hospedante

susceptible. Asimismo, se demostró que estos estadios biológicos del nematodo, pueden formar parte del inóculo inicial primario en los siguientes ciclos de siembra. (Cristobal *et al.*, 2001a)

Dado que esta especie ataca un gran número de importantes cultivos agrícolas, causando agallas sobre las raíces, similares a aquellas producidas por el género *Meloidogyne*, es posible que su diseminación sea mayor a la indicada por los datos actuales de distribución. Los estadios juveniles J₃, J₄ y hembras jóvenes son los estadios infectivos de este nematodo. Los estadios juveniles atacan raíces y generalmente inducen pequeñas agallas. Luego de su penetración, la presencia de necrosis en el tejido cortical se torna evidente. Los nematodos mudan, pudiendo o no atravesar por un periodo de quiescencia. Esto es aparentemente dependiendo del hospedante y de la temperatura. Una vez que las hembras inmaduras se forman, pueden salir del tejido radicular, atacar raíces adyacentes o migrar dentro del tejido radicular y establecerse, causando agallas radiculares. Aunque el proceso de migración interna puede ocurrir, parece ser ocasional las hembras inmaduras penetran a las raíces causando necrosis inicial seguida de formación de agallas (Jatala, 1979^a) (Fig.6).

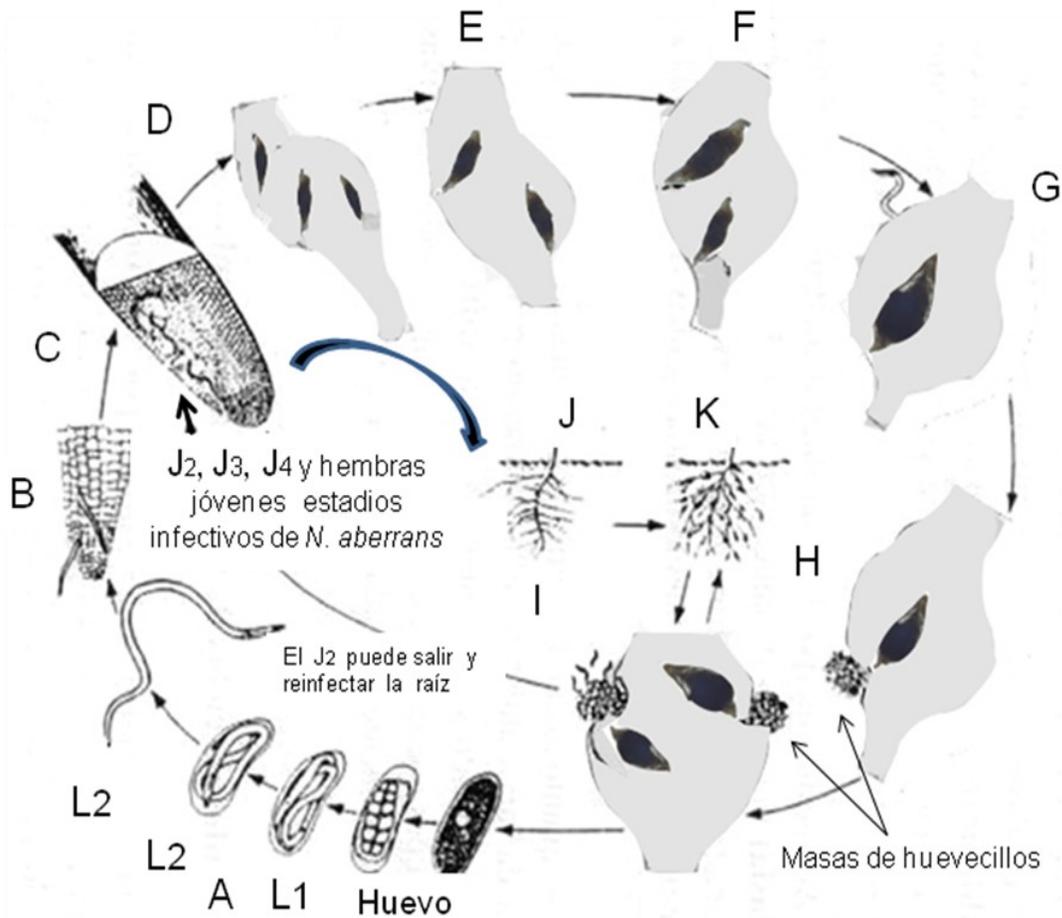


Figura 6: Representación del ciclo biológico de *N. aberrans*. A) Etapa de embriogénesis, B) Segunda etapa larvaria ataca raíces, C) J₂, J₃, J₄ y hembras jóvenes invaden la raíz como inoculo primario, D) J₂ Se alimenta de células puede salir y reinfectar la raíz formando falsos nodulos, E) Tercera etapa larvaria, F) Cuarta etapa larvaria, G) Nematodos adultos, el macho abandona la raíz, H) Hembra deposita huevos en ovisaco, I) Las agallas contienen hembras ovíparas fuente de infecciones J, K) Índice de agallamiento.

4.2.6 Sintomatología

En general, los síntomas más característicos de las plantas infectadas por *N. aberrans* son: reducción del crecimiento (achaparramiento), clorosis del follaje, marchitez súbita (bajo condiciones de poca humedad) y una reducción significativa en el rendimiento, la cual se caracteriza por la presencia de frutos pequeños y con poca aceptación en el mercado; cabe mencionar que estos síntomas provocados en el follaje, pueden confundirse fácilmente con los

provocados por otros patógenos y plagas. De acuerdo con Zamudio (1987), las plantas infectadas con *N. aberrans* presentan un menor peso de follaje verde y raíces, en comparación con plantas libres del nematodo. En las raíces, el síntoma más peculiar es la formación de agallas (Cid del Prado, *et al.*, 1995). Al inicio de la infección, las agallas se encuentran separadas, y en su interior alojan a una sola hembra (Manzanilla-López *et al.*, 2002), pero a medida que la infección aumenta también lo hace el número de agallas, haciéndose más próximas entre sí y adoptando el aspecto de cuentas de rosario que en algunos casos llegan a contener a más de una hembra. Debido al aspecto de las agallas es que en países como Perú, Bolivia y Argentina se le conoce como nematodo del “rosario” (Costilla 1981, citado por Zamudio, 1987). Cabe resaltar que por el hecho de que los J₂, J₃, J₄ y las hembras jóvenes son estadios infectivos (Clark, 1967; Cid del Prado, 1985; Cristóbal *et al.*, 2001; Manzanilla-López *et al.*, 2002), éstos tienen la capacidad de entrar y salir de la raíz, así como de moverse entre las células de la corteza dentro de las raíces y causar severos daños a las plantas hospedantes (Castillo, 1988). Desde el punto de vista nutrimental, Cristóbal (2001) encontró que las plantas de tomate inoculadas con *N. aberrans* tenían una menor cantidad de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio, en raíces y follaje, con respecto a las plantas sin inocular; esto explicaría en parte el porque las plantas cultivadas e infectadas por el nematodo tienen un menor desarrollo.

4.2.7 Hospederos

La gama de hospedantes de *N. aberrans* es amplia e incluye varias plantas cultivables y algunas malezas Inserra, (1985), Franco *et al.*, (1999) mencionan que *N. aberrans* es un parásito restringido al cultivo de papa y del tomate, sin embargo, posee una cantidad mayor de hospedantes que comprenden 17 familias, con 69 especies cultivadas y no cultivadas o malezas.

(Montoya, 1994) determinó el rango de hospederos del nematodo falso nodulador en algunos municipios de Zacatecas, encontrando que la acelga, lechuga, pepino, melón, calabaza, chícharo, sandía y repollo, son susceptibles de mayor a menor grado; Mientras que la cebolla, coliflor, chile mirasol, rábano, chile tampiqueño, jitomate, papa, y zanahoria resultaron inmunes al agallamiento por *N. aberrans*. Algunas malezas que resultaron hospederas (mostraron agallas) de acuerdo con este trabajo fueron: verdolaga de puerco (*Alternanthera repens*), quelite morado (*Amaranthus hybridus*), mala mujer (*Solanum rostratum*), trompillo (*Solanum elaeagnifolium*), quesitos (*Malva parviflora*) amarradora (*Convolvulus equitans*, alfilerillo (*Erodium cicutarium*) quelite cenizo (*Chenopodium album*), y maromera (*Salsola ibérica*).

Dentro de las malezas, Cruz *et al.* (1987) demostraron que *N. aberrans* también ataca al trébol (*Trifolium* sp.), mala mujer (*Solanum nigrum*), diente de león (*Taraxacum officinalé*) y quelite (*Amaranthus hybridus*). Por su parte, Cid del Prado *et al.* (1995), encontraron a *N. aberrans* en algunas malezas asociadas al maíz y al tomate, lo que sugiere que en hospederos alternantes, el nematodo puede mantener activas sus poblaciones. Respecto a las plantas cultivadas, Montes-Belmont (1986) enlistó una serie de plantas de importancia económica susceptibles al nematodo, tal es el caso del tomate, chile, tomate de cascara, frijol, chícharo, pepino, calabaza, col, brócoli, lechuga y acelga. De acuerdo con Zamudio *et al.* (1987), bajo condiciones de invernadero el tomate cv. AGE 55 VF, la calabaza cv. Zucchinni gray y el frijol ejotero cv. Black Valentina, son variedades muy susceptibles al nematodo falso nodulador, aunque no así la sandía cv. Charleston gray, el chile cv. Criollo mulato y el ajo cv. Criollo de Puebla, los cuales resultaron resistentes al nematodo.

4.2.8 Métodos de control de *N. aberrans*

4.2.8.1 Control genético

Respecto a la generación de variedades resistentes a nematodos inductores de agallas (*Meloidogyne* spp. y *N. aberrans*), algunos de los estudios que se han realizado han sido con plantas principalmente de las familias Fabaceae y Solanaceae. Ortega (1990) evaluó la resistencia a *M. incógnita*, de 16 variedades de frijol y encontró que las variedades más susceptibles fueron la RS-101 y la 801744; las variedades más resistentes, así como las de mejores rendimientos, fueron la Fiesta y la Uf-114. Por su parte, Zamudio (1987) evaluó 60 variedades de tomate y encontró a las variedades Cómala, 1-11-4-1 y 1-24-3-1 como muy susceptibles a *N. abetrans*, en comparación con las variedades Campbell 34, 1-29-3-1 y Napoli VF, las cuales fueron altamente resistentes. Castillo (1988) cultivó *C. baccatum* en presencia de *N. aberrans* y encontró que variedades criollas de este chile eran tolerantes al ataque del nematodo, ya que permitieron la reproducción del fitopatógeno sin afectar significativamente el desarrollo de las plantas.

4.1.8.2 Control cultural

4.1.8.2.1 Solarización del suelo

Esta estrategia consiste en cubrir el suelo húmedo con plástico transparente delgado, con el fin de incrementar las temperaturas y así se destruya una gran cantidad de inóculo de fitopatógenos, estadios larvales de insectos y semillas de arvenses presentes en él. Un resultado satisfactorio dependerá de la duración del tratamiento, la intensidad de la radiación solar y la conductividad térmica del suelo. La solarización del suelo puede reducir las poblaciones de nematodos, aunque en mayor medida reduce las de hongos y arvenses. Debido a que los nematodos son más

tolerantes al calor y su control es menos efectivo a profundidades del suelo mayores de 30cm (Ramírez, 1996).

En un experimento para evaluar la influencia del plástico sobre *N. aberrans* y *P. capsici* en el cultivo del tomate, Yañez (1997) encontró que los surcos cubiertos con plástico transparente, alcanzaron mayor temperatura con respecto a los cubiertos con plástico negro; además, en los primeros se redujo el nivel de inóculo del nematodo hasta en un 68.9% y el del hongo hasta un 86.3%, con respecto al testigo sin plástico.

4.1.8.2.2 Aplicación de materia orgánica en suelo

Una fuente rica en materia orgánica son los abonos orgánicos composteados, los cuales se elaboran a partir de estiércol de diferentes animales como bovinos, ovinos, caprinos y aves (Velasco, 2002). La incorporación de materia orgánica al suelo, provee de nutrimentos disponibles a las plantas e incrementa la actividad microbiana del suelo; además, puede ayudar a controlar poblaciones de fitopatógenos (González y Canto, 1993) a través de la liberación de amonio y compuestos azufrados mediante un proceso llamado Biofumigación. A través de este proceso se liberan diferentes compuestos como isotiocianatos, sulfuros, disulfuros, trisulfuros y mercaptanos producto de la descomposición de materiales orgánicos de crucíferas, estos compuestos han mostrado un efecto antagónico sobre nematodos agalladores, sobresalen los residuos de crucíferas (Zavaleta-Mejía y Rojas, 1990; Rosa y Rodríguez, 1999; Riegel y Noe, 2000; Pattison *et al.*, 2003). En un experimento con plantas de tomate, cultivadas bajo condiciones de campo e invernadero, en presencia de *N. aberrans* y fertilizadas con vermicomposta, Zavaleta *et al.* (2004) observaron una reducción significativa en el daño a las raíces de las plantas fertilizadas con vermicomposta, a diferencia de las plantas sin dicho abono;

además, las plantas fertilizadas, desarrollaron un mayor peso fresco de follaje con respecto a las que no se fertilizaron.

Otra forma de adicionar materia orgánica al suelo es a través de la aplicación de enmiendas orgánicas, lo cual contribuye a la reducción de las poblaciones de nematodos de manera considerable. Por ejemplo, la incorporación de paja de maíz al suelo reduce el efecto de *N. aberrans*, ya que disminuye las poblaciones de juveniles en raíces de tomate (Montes-Belmont, 1973). Experimentos realizados por Cristóbal et al., 1996; Franco (2002) en plantas de tomate cultivadas en un predio naturalmente infestado con *N. aberrans*, se encontró que al incorporar fragmentos de col a una dosis de 52 ton ha, es posible reducir el número de juveniles del nematodo tanto en suelo como en raíces, con respecto al resto de los tratamientos; también observó que el mejor momento para adicionar dicha enmienda al terreno era una semana antes del trasplante o bien al momento del mismo. En un trabajo similar, Rodríguez *et al.* (2004) logró reducir las poblaciones y daños ocasionados por *M. arenaria* y *M. incognita* en tomate, melón, sandía y pepino, incorporando residuos de col a una dosis de 80 ton ha. Por su parte Gómez *et al.* (1991) incorporaron al suelo residuos de cempazúchilt a los 30 y 15 días antes del trasplante de tomate y al momento de este; los tratamientos en donde se incorporaron los residuos a los 30 y 15 días antes del trasplante mostraron una reducción significativa de la población de *N. aberrans* en comparación con el testigo, así como un aumento en la producción del cultivo.

Una variante en la aplicación de enmiendas al suelo, es partir de plantas utilizadas bajo un sistema de rotación de cultivos. Considerando que al cosechar cualquier cultivo en rotación se queda en el terreno una gran cantidad de materia orgánica (residuos), éstos pueden ser

incorporados al suelo mediante las labores normales que se realizan en el terreno (rastreo, barbecho, etc.), para luego cultivar la especie de hortaliza de interés.

4.1.8.3 Control biológico

Hongos nematófagos como biocontroladores de nematodos fitopatógenos

Los agentes de control biológico de nematodos más eficientes son los hongos, dentro de los cuales se encuentran varios tipos dependiendo de su estrategia para destruir o parasitar a los nematodos; debido a esta peculiar actividad antagónica, estos hongos reciben el nombre de hongos nematófagos (Kendrick, 2000).

Uno de los grupos de hongos nematófagos a destacar son los atrapadores de nematodos, principalmente de los géneros *Arthrobotrys*, *Monacrosporium* y *Dactylaria*. Estos hongos pueden producir trampas adhesivas en forma de red o poseer anillos constrictores o adhesivos. Este grupo de hongos son fáciles de producir *in vitro* y tienen una amplia gama de hospedantes, aunque su sobrevivencia en suelo es muy baja. Por otro lado, se conoce poco acerca de las condiciones en las cuales se produce la trampa y su viabilidad; de hecho, existen reportes acerca de la capacidad de algunos nematodos para sobrevivir aún estando atrapados por este tipo de hongos e inclusive terminar su ciclo biológico (Brown y Kerry, 1987).

Otro grupo de hongos nematófagos muy importante son los endoparásitos de huevos. Estos se producen con relativa facilidad *in vitro*, en suelo pueden comportarse como saprofitos facultativos y algunos poseen la habilidad de colonizar la rizósfera de varias plantas; este tipo de características les permite sobrevivir en suelo inclusive en ausencia de sus hospedantes. Como muchos otros hongos, los que pertenecen a este grupo requieren de temperaturas templadas a cálidas para su óptimo desarrollo (Domsch y Gams, 1980). Las especies más estudiadas son *Paecilomyces lilacinus* y *Pochonia chlamydosporia*.

En México, *P. lilacinus* se ha utilizado para controlar poblaciones de nematodos agalladores. Díaz (1986), encontró que a mayores concentraciones del hongo, el índice de agallamiento causado por *Meloidogyne* spp. en melón, fue más bajo; por su parte Sosa *et al.* (1982), encontraron que a mayores dosis del hongo, tanto en plantas de tomate como de frijol, los síntomas aéreos causados por *N. aberrans* eran más notorios. En estudios posteriores contra el mismo nematodo, Gómez *et al.* (1987) y Pérez (2003), no observaron una reducción en el daño de raíces de tomate crecido en suelo infestado con *N. aberrans* bajo dosis alguna del hongo.

En lo que a *P. chlamydosporia* se refiere, éste es un parásito facultativo muy eficiente y con capacidad de colonizar la rizósfera de varios cultivos de importancia económica, mismos que resultan ser susceptibles a nematodos agalladores y formadores de quistes (Kerry, *et al.*, 1984; De Leij *et al.*, 1992; De Leij *et al.*, 1993), e inclusive que son poco o no susceptibles a nematodos como *N. aberrans* (Flores, 2003; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007; Franco-Navarro *et al.*, 2006). Estas características han hecho de *P. chlamydosporia* un agente de control biológico con enorme potencial (Crump y Irving, 1992).

En un estudio realizado por De Leij *et al.* (1992), se encontró que *P. chlamydosporia* es capaz de colonizar raíces agalladas por *M. incógnita* hasta en un 100% y que el crecimiento más abundante del hongo se da en las zonas más dañadas por el nematodo. Crump y Irving (1992) observaron que *P. chlamydosporia* es capaz de reducir la eclosión de huevos en un 75% y 76% en *Heterodera schachtii* y *Globodera pallida*, respectivamente. Por su parte De Leij y Kerry (1991), al evaluar la eficiencia de tres aislamientos de *P. chlamydosporia* contra *M. arenaria* en tomate, encontraron que un aislamiento denominado como Vc10 pudo reducir hasta en un 80% las poblaciones del nematodo. En otro estudio,

Hirsch *et al.* (2001) observaron que los suelos donde se aplicó al hongo durante varios ciclos de cultivo, éste se estableció y continuó reduciendo las poblaciones de nematodos formadores de quistes, incluso sin la aplicación de más inóculo del hongo.

En nuestro país se han realizado varios estudios con el fin de determinar la eficiencia biocontroladora de *P. chlamydosporia* sobre *N. aberrans*. Por ejemplo, Flores (2003) realizó diferentes muestreos en parcelas infestadas naturalmente con *N. aberrans*, en los estados de Estado de México, Morelos, Puebla y Tlaxcala, e identificó cinco aislamientos nativos de *P. chlamydosporia*; de dichos aislamientos evaluó su eficiencia parasítica sobre huevos de *N. aberrans* provenientes de diferentes partes de la República Mexicana. Observó que uno de los aislamientos fue el más agresivo tanto sobre una población del Estado de México (82%), como sobre una población proveniente de Puebla y otra de Zacatecas (88% y 86%, respectivamente). Con estos mismos aislamientos mexicanos, Doroteo (2006) llevó al cabo una prueba *in vitro* de parasitismo de huevos de *N. aberrans* provenientes de dos poblaciones distintas. La adición del hongo se hizo a partir de dos fuentes de inóculo, utilizando crecimientos de *P. chlamydosporia* en placas de Papa-Agar de 21 días de edad, y a partir de arroz colonizado previamente por el hongo. Se encontró que el aislamiento etiquetado como SC1 parásito cerca del 89% y 83.4% de los huevos de *N. aberrans* de ambas poblaciones, ello al utilizar arroz colonizado como fuente de inóculo; cuando la fuente del hongo fueron crecimientos en cajas Petri, el aislamiento denominado SMB3 fue uno de los parásitos de huevos más eficiente, ya que se obtuvo un parasitismo del 87% de los huevos de la población Montecillos; el otro aislamiento, el SC1, parásito un 81.2% de los huevos de la población Tecamachalco.

Pérez-Rodríguez *et al.* (2007), al evaluar los cinco aislamientos encontrados por Flores (2003), sobre el control de *N. aberrans* en tomate cv. Río Grande, bajo condiciones de invernadero, encontró que las plantas inoculadas con un aislamiento etiquetado como SC1 a una concentración de 15,000 clamidosporas g⁻¹ de suelo, presentaron una biomasa mayor que el resto de los tratamientos; de igual manera, en estas mismas plantas se observaron las menores poblaciones del nematodo y el menor daño en raíces. Además, el hongo pudo reaislarse a partir de suelo, raíces y trozos de masas de huevo de *N. aberrans*, lo cual fue evidencia del parasitismo de *P. chlamydosporia* sobre el nematodo. En un experimento similar, Hernández (2005) probó los mismos aislamientos, solo que como hospedante susceptible al nematodo uso chile ancho cv. San Luis; al final del experimento se pudieron reaislar dos aislamientos, el etiquetado como SC1 y otro denominado SMB3A, esto a partir de suelo y raíces.

4.1.8.4 Control químico

Los nematicidas sintéticos, como la gran mayoría de los productos químicos destinados al control de plagas y enfermedades, resultan en muchas ocasiones más prácticos y fáciles de usar que otras alternativas de control; además, su uso resulta más económico cuando otros métodos de control son menos eficientes o difíciles de aplicar. En general, los nematicidas suelen ser muy usados en hortalizas de alto valor comercial (Lamberti y Taylor, 1979). Al respecto existen algunos trabajos en los que se ha documentado la eficiencia de estos productos para el control de nematodos, específicamente el falso nodulador. Por ejemplo, Saad *et al.* (2004) encontraron que aplicando Mocap® (i.a. ethoprophos) y Vapan® (i.a. metam sodio) en papa, las infecciones de *M. chitwoodi* en tubérculos, se reducían hasta en un 91.6%. Por su parte Marban y Zamudio (1982) encontró que los nematicidas aldicarb (a 7 y 15 kg ha), fenamifos (a 40 y 20 kg ha) y carbofuran (a 40 y 20 Kg ha), controlaron a *N. aberrans* elevándose a su vez la producción de

tomate en un 52% a un 79%. Por su parte Aparicio *et al.* (1989), probaron el efecto de la urea y el sulfato de amonio sobre J_2 de *N. aberrans* bajo condiciones de laboratorio; sus resultados demostraron que mientras más alta era la dosis de urea, el número de J_2 muertos era más elevado, principalmente a una dosis de 120 Kg/ha.

4.3 Biopolímeros Naturales Quitina-quitosano.

4.3.1 Introducción

Los polímeros han existido en forma natural desde el inicio de la vida, y aquellos tales como DNA, RNA, proteínas y polisacáridos juegan un papel crucial en animales y vegetales. Desde la antigüedad, el hombre ha explotado los polímeros naturales para proveerse alimento, ropa, abrigo, armas, materiales de escritura y otros requerimientos. Sin embargo, comúnmente se acepta el hecho de que el origen de la industria polimérica actual dio inicio en el siglo XIX, cuando se hicieron importantes descubrimientos con respecto a la modificación de ciertos biopolímeros (Young y Lovell, 1991).

Como tal, la ciencia de los polímeros apareció por primera vez en 1930, seguida de un gran desarrollo tecnológico. En general, la ciencia de los materiales poliméricos o macromoléculas se divide en materiales biológicos y no biológicos, cada uno de las cuales es de gran importancia. Los polímeros biológicos constituyen una parte fundamental de la vida y proveen la mayor parte de los alimentos consumidos por el humano, mientras que los no biológicos son empleados para elaborar materiales plásticos sintéticos (Billmeyer, 1984).

México se encuentra dentro de los principales productores de camarón en el ámbito mundial y por ello las industrias que procesan el camarón del cual se extraen el biopolímero quitina-quitosano, generan grandes cantidades de desperdicios, entre los que se encuentran residuos

sólidos, cabezas y cáscara de camarón ocasionando graves problemas ecológicos. (Shirai *et al.* 1997). Por tal la utilización de componentes de los residuos sólidos del camarón resulta un aspecto, interesante y atractivo; ya que por un lado, contribuye a la disminución del volumen de desperdicios generados y por otro se recuperan productos como enzimas, quitina y ácidos nucleídos. (Rangar *et al.* 1990)

En las cutículas de crustáceos, la quitina se encuentra fuertemente asociada con sales inorgánicas, tales como carbonatos de calcio, proteínas, pigmentos y lípidos. De ahí que el proceso convencional por métodos químicos para la obtención de quitina a partir de residuos de crustáceos, consiste principalmente en tres etapas: eliminación de lípidos con solventes, seguida de una desmineralización con ácidos diluidos, desproteización con álcalis a temperatura moderada, finalmente un blanqueado con una solución de hipoclorito de sodio. (Shirai *et al.*, 1996)

La quitina se encuentra en tres formas que difieren cada una en su arreglo molecular, así se tiene a la α -quitina que se encuentra en forma compacta, el arreglo de las cadenas es antiparalelo; β -quitina a diferencia de la anterior presenta cadenas en paralelo y en la γ -quitina dos cadenas se extienden hacia arriba por cada cadena que se encuentra hacia abajo. Se han aislado las tres formas en diferentes partes anatómicas del mismo animal por lo que se piensa que este polimorfismo es debido a diferentes funciones y no al grupo biológico a que pertenece el animal. La forma α es la más estable, y es comúnmente asociada con depósitos minerales, mientras que la β y γ -quitinas parecen estar asociadas con proteínas del tipo colágeno, proporcionando tenacidad, flexibilidad y movilidad. (Muzzarelli, 1977).

En su forma natural, la quitina se presenta parcialmente desacetilada, la diferencia entre quitina y quitosano es de hecho arbitraria ya que las formas completamente acetiladas o desacetiladas no

existen en la naturaleza ni como productos finales de un proceso, por lo que en la práctica al polímero que presenta mayor acetilación se le denomina quitina y al más desacetilado quitosano (Hansen y Llanes 1994).

La quitina, además de encontrarse en crustáceos, se encuentra en el exoesqueleto de artrópodos y en las paredes celulares de hongos. Es el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Se calcula que más de 100 billones de toneladas de quitina son producidas anualmente por estos animales y microorganismos (Simpson y col., 1994). Químicamente es análoga a la celulosa, el monomero de la quitina es el 2-acetoamida-2-desoxi- β -D-glucosa, cuya fórmula estructural es $(C_8H_{13}NO_5)$. En la quitina los grupos amino están acetilados, la quitina desacetilada es conocida como quitosano, que es polímero β (1-4) de monómeros de 2-amino-2-desoxi- β -D-glucosa. (Shirai, 1996)

El quitosano es un biopolímero obtenido a partir de la desacetilación de la quitina, la cual es un biopolímero unido por enlaces β -1-4 de la N-acetil-D-glucosamida y se produce en grandes cantidades en la naturaleza; se ha estimado que la producción anual de la quitina es de 10¹⁰ a 10¹¹ toneladas y los desechos de crustáceos son las mejores fuentes de este material, aunque también puede encontrarse en las paredes celulares de microorganismos y plantas. A diferencia de la quitina, el quitosano se caracteriza por poseer una carga positiva, la cual le confiere potenciales aplicaciones en diversos campos de investigación. Este biopolímero es biodegradable, no tóxico y biocompatible para humanos y para la mayoría de los animales (Felse y Panda, 1999).

Representación esquemática de las cadenas de (a) celulosa; (b) quitina totalmente acetilada y (c) quitosano totalmente desacetilado (Fig.7). La similitud estructural entre ellas resulta evidente, la longitud de las cadenas varía de acuerdo al número de unidades existentes en la molécula, lo cual

se conoce como grado de polimerización. Conforme aumenta el grado de polimerización, la sustancia se hace grasienta, luego cerosa y finalmente sólida, cuando el grado de polimerización es alrededor de 1000; es entonces cuando se habla de un verdadero polímero (Anderson *et al.*, 1977; Billmeyer, 1984).

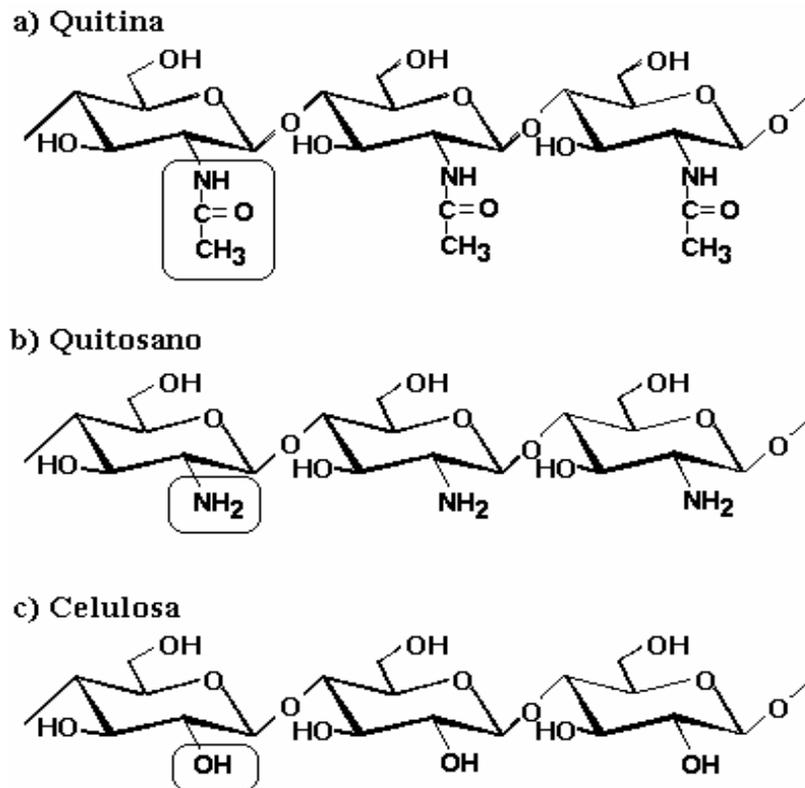


Figura 7: Estructuras químicas de la quitina, quitosano y la celulosa.

4.3.2 Procesos de obtención por la vía Microbiana.

Los procesos tradicionales (ácido álcali) para obtener quitina resultan agresivos a la ecología y en ocasiones a la calidad del producto ya que es posible ocasionar depolimerización. Lo anterior ha promovido la búsqueda de métodos alternativos, que involucran el uso de enzimas y/o microorganismos. Bacterias ácido lácticas aisladas de camarones tropicales, identificadas como *Lactobacillus casei* (A3) y *Lactobacillus sp.* (B2) e iniciadores comerciales de Christian Ilansen:

Floracarn SL (*Lactobacillus pentosus* y *Staphylococcus carnosus* proporción 1:2) y LP-1 (*Lactobacillus pentosus*) son utilizadas en la degradación microbiana de la quitina. (Shirai, *et al.*, 1999)

4.3.3 Procesos de obtención por la vía ácido álcali.

En las cutículas de crustáceos, la quitina se encuentra fuertemente asociada con sales inorgánicas, tales como carbonatos de calcio, proteínas, pigmentos y lípidos (Attwood y Zola, 1967; Fox, 1973; Muzzarelli, 1977; Shimahara y Takiguchi, 1988) (citados por Shiari, 1999). De ahí que el proceso químico convencional para la obtención de quitina, a partir de esqueletos de crustáceos, consiste principalmente de tres etapas: desproteinización de la quitina con álcalis a temperatura moderada, seguida de una desmineralización con ácidos diluidos y finalmente una eliminación de lípidos con solventes orgánicos, esta última es opcional. Las etapas anteriormente mencionadas se llevan a cabo en el orden indicado (Fig.8) (Ockerman, 1992).

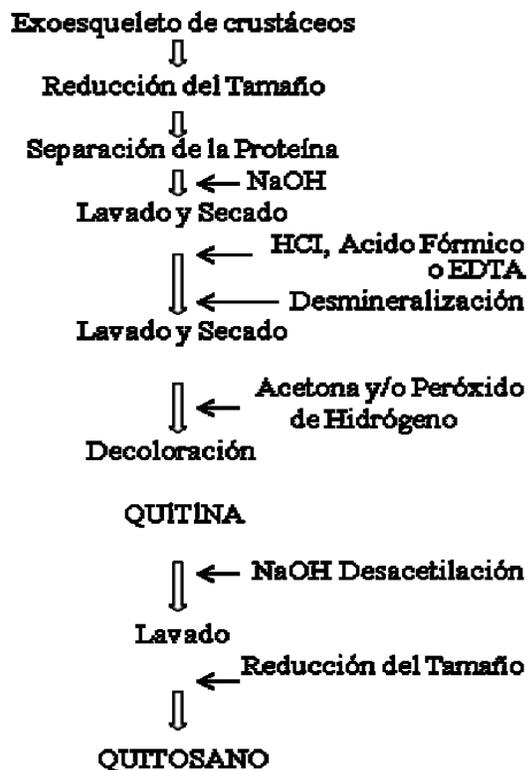


Figura 8: Proceso convencional para la obtención de quitina y quitosano (Shirai, 1999)

5.1 Propiedades de la quitina.

La quitina es un compuesto biodegradable no tóxico, insoluble en agua y soluble en la mayoría de solventes orgánicos. Son solventes efectivos de la quitina: N, N-dimetilacetamida con 5% de cloruro de litio, hexafluoroisopropanol, sesquihidrato de hexafluoroacetato, cloroalcoholes (2-cloroetanol), ácidos minerales concentrados y en ácido fórmico anhídrido (Muzzarelli, 1977). Se puede despolimerizar mediante el uso de ácidos fuertes. Su calor específico es de 0.373 ± 0.03 cal/g/°C. La higroscopicidad de la quitina es similar a la de fibras de celulosa, aunque su superficie es menos activa y permeable al agua que la de las fibras de celulosa (Hirano, 1986).

5.2 Propiedades del quitosano.

Este compuesto soluble en soluciones diluidas de ácidos orgánicos, insoluble en solventes orgánicos y a concentraciones de ion hidrógeno por encima de pH 6.5. Es soluble en soluciones de ácido clorhídrico y nítrico al 0.15 hasta 1.1% pero insoluble a concentraciones del 10%. Es insoluble a cualquier concentración de ácido sulfúrico y es ligeramente soluble en ácido ortofosfórico al 0.5% de concentración. El mejor solvente para el quitosano es el ácido fórmico, donde se obtienen soluciones desde concentraciones de fórmico de 0.2 hasta 100 % (Austin, 1988).

Las propiedades del quitosano son muy similares a la de la celulosa, tanto en su estructura química como en su actividad. Debida a la presencia de grupos aminos en la cadena polimérica, el quitosano es un material muy versátil. Tiene la capacidad de realizar varias modificaciones, como reacción con enzimas y obtención de películas biodegradables.

Debido a la presencia de grupos amino libres tiene la propiedad de protonarse y por lo tanto ser soluble en medio ácido, aumentando así su reactividad. Su característica principal es la inocuidad

a la salud humana. El quitosano es un polisacárido catiónico y se une de forma electrostática a las moléculas con carga eléctrica negativa. (Shirai, 2004),

Los grupos aminos libres del quitosano le confieren propiedades importantes. Cuando se solubiliza en ácido diluido el quitosano funciona como un polímero catiónico de estructura lineal con una alta densidad de carga positiva, esta carga puede ser aplicada en procesos de floculación, en la formación de capas e inmovilización de reactivos biológicos incluyendo enzimas. Otra propiedad importante es su habilidad para actuar como una barrera de la humedad en cosméticos, como agente quelante de cationes, y como encapsulante cuando no tiene carga positiva (Van Ornum, 1992).

5.3 Aplicaciones quitina-quitosano.

El campo de utilización del quitosano es variado y comprende: tratamiento de aguas, industria alimentaria, medicina, biotecnología, agricultura, cosmética, industria papelera, tecnologías de membrana, alimentos nutraceuticos (debido a la característica de solubilidad y posibilidad de obtener múltiples compuestos derivados) y en la industria textil.

Como interés especial, en el campo de alimentos y bebidas el quitosano se utiliza principalmente como aditivos. Ya sean estos espesantes (proporcionando mayor viscosidad al producto), gelificantes (debido a que precipita a un pH superior a 6) estabilizando emulsiones y como agente preservante (utilización en productos de panificación por su acción antifúngica y antibacteriana) adicional mente el quitosano se utiliza como recubrimiento protector de frutas y hortalizas. Las películas de quitosano son resistentes duraderas y flexibles incidiendo en la vida útil del producto. De esta manera estas películas minimizan la velocidad de respiración y pérdida de agua en la fruta o del vegetal.

Cuando se elaboran alimentos mínimamente procesados la acción del quitosano es importante como agente preservante frente a microorganismos como bacterias levaduras y hongos. El uso de concentraciones mayores al 0.02% protegen al alimento frente a una posible contaminación de *Escherichia coli*. La acción antimicrobiana se realiza privando a los microorganismos de iones vitales como el cobre bloqueando o destruyendo la membrana filtrando constituyentes intracelulares y formando complejos polielectrolíticos como polímeros ácidos y células de superficie. La acción antimicrobiana del quitosano es influenciada por factores intrínsecos tales como tipo de quitosano el grado de polimerización, la composición química y las condiciones ambientales. (Baxter, 2004).

5.4 Uso de quitina-quitosano en el manejo de fitopatógenos.

Se ha demostrado que el quitosano posee propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos. Algunos autores han reportado que el grupo amino en la posición del carbono 2 del residuo de glucosamina es el que le da la característica antimicrobiana al quitosano, siendo por ello que este biopolímero se ha empleado en solución para inhibir el crecimiento de microorganismos como *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y patógenos post-cosecha comunes, además de que se ha reportado que disminuye el crecimiento de los hongos *Trichophyton equinum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger* (Hirano y Nagao, 1989; El Ghaouth y col., 1991; Plascencia y col., 2003). Con base en lo anterior, es importante el estudio detallado de las propiedades antimicrobianas del biopolímero, utilizando otras formas de aplicación del quitosano. Desde luego, la eficiencia inhibitoria del biopolímero depende del modo de aplicación, peso molecular, dosis y del sistema vegetal-microorganismo en estudio (Struszczyk y Pospieszny, 1997).

Reddy y col. (1999) recubrieron semillas de trigo con soluciones de quitosano de concentración $\geq 4 \leq 8$ g/L, encontrando que el biopolímero mejoró significativamente la germinación y resistencia de las semillas, estimulando la síntesis de compuestos fenólicos y lignina en las hojas, además de reducir el desarrollo de *Fusarium graminearum*. En un experimento similar, Zhang y Quantick (1998) observaron que a 13°C, el quitosano (10 y 20 g/L) redujo notablemente el deterioro de fresas y cerezas ocasionado por *Botrytis cinerea* y *Rhizopus sp.*, induciendo un incremento significativo en la actividad enzimática de quitinasas y β -1-3-glucanasas; asimismo, cuando los frutos fueron almacenados a 4°C se encontró un efecto benéfico en cuanto a la firmeza, acidez total titulable, contenido de vitamina C y contenido de antocianina.

En un estudio previo, El Ghaouth y col. (1991) utilizaron soluciones del biopolímero (10 y 15 g/L) para recubrir fresas, encontrando resultados similares a los reportados por (Zhang y Quantick, 1998). Los frutos cubiertos con el biopolímero y almacenados a 4°C fueron más firmes y con mayor acidez total titulable, con una velocidad de síntesis de antocianina menor a la de Rovral®, un fungicida comercial (iprodiona); asimismo, se encontró que el quitosano redujo la velocidad de respiración. Posteriormente, los autores estudiaron el efecto *in vivo* del biopolímero sobre la vida postcosecha de productos vegetales (tomates, pimiento y pepino), encontrando que el tratamiento con quitosano redujo la velocidad de respiración y la producción de etileno de los tomates, modificando la atmósfera interna y mejorando la firmeza, color y acidez total titulable; en los pepinos y pimientos se observó que el biopolímero redujo la pérdida de peso y la velocidad de respiración (El Ghaout y col., 1997); el estudio *in vitro* mostró que el quitosano no solamente inhibió el crecimiento de patógenos postcosecha comunes, sino que también indujo la degradación de aminoácidos y proteínas en *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*, además de inducir severos cambios morfológicos caracterizados por alteraciones en la

pared celular los cuales fueron atribuidos en parte a la capacidad del quitosano para estimular la actividad de enzimas quitinasas (quitin deacetilasas) en *R. stolonifer*. (citado por Placencia *et al.*, 2003).

Estudios *in vivo* han demostrado que el quitosano es capaz de formar películas impermeables al oxígeno y al dióxido de carbono y también se ha reportado que, en tejidos vegetales, este biopolímero es capaz de actuar como un inductor de la síntesis de enzimas de defensa (por ejemplo quitinasas y glucanasas) que degradan las paredes celulares de hongos, además de otras moléculas de defensa como compuestos fenólicos, fitoalexinas y pisatina (Hirano y Nagao, 1989; El Ghaouth y col., 1991; Benhamou, 1992; Benhamou y col., 1994; Krochta y col., 1994; El Ghaouth y col., 1997; Reddy y col., 1999). Asimismo, se han estudiado las propiedades antimicrobianas del quitosano en películas con polímeros tales como celulosa, y se reporta un aumento en la inhibición del crecimiento de microorganismos como *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Trichophyton equinum*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa* (Seo y col., 1997; Shin y col., 1997; Shin y col., 1999).

Actividad antifúngica del quitosano. La actividad antifúngica del quitosano se ha evaluado en diferentes especies de hongos, los resultados derivados de los estudios *in vitro* fundamentalmente han estado relacionados con el crecimiento micelial, la esporulación, la germinación y la morfología de las hifas y esporas. Los efectos obtenidos han sido diferentes, algunos autores los relacionan con las concentraciones de quitosano aplicadas, otros con el grado de polimerización de la cadena de glucosamina, el nivel de desacetilación e inclusive con el tiempo de exposición del polímero en la célula fúngica (Bautista-Baños *et al.*, 2004^a; Cheah *et al.*, 1997; Du *et al.*, 1998; El Ghaouth *et al.*, 1992^{a,b}). Cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis y Shoemaker, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer*, aisladas de papaya (*Carica papaya*

L.), presentaron una inhibición del crecimiento micelial (superior al 50%) a concentraciones de quitosano de 1.5% en adelante, observándose una correlación directa entre la concentración de quitosano y la inhibición del crecimiento. La esporulación mostró un comportamiento similar, a excepción de *P. digitalis* la cual se estimuló en presencia de quitosano (Bautista-Baños *et al.*, 2004^a). Estos autores también reportan cambios en la morfología de las esporas (área, longitud y forma) de acuerdo al tratamiento y/o tiempo de incubación comparados con las esporas no tratadas. Por otro lado, concentraciones bajas de quitosano (0.05 y 0.20%) inhibieron marcadamente el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. aislado de durazno (*Prunus persica* Batsch), pera japonesa (*Pyrus pyrifolia* Nakai ov, Shinko and Housui) y kiwi (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang *et al.* Ferguson var. *deliciosa*) (Du *et al.*, 1997). En contraste, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, patógeno de las zanahorias (*Daucus carota* L.) presentó inhibición de su crecimiento radial sólo con altas concentraciones de quitosano (4%) (Cheah *et al.*, 1997). Otros estudios sugieren que el quitosano puede tener efecto fungicida o fungistático dependiendo de la concentración a la que se utilice. Por ejemplo, el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz y Saco, aislado de papaya, se inhibió totalmente con concentraciones de quitosano al 2.5 y 3.0% durante 7 días de incubación, mientras que a 0.5 y 1.5% el hongo comenzó a crecer al segundo y cuarto día, respectivamente. Además se evidenciaron tanto una reducción en la esporulación como cambios morfológicos en los conidios (área y factor de forma elíptica) a concentraciones de quitosano superiores a 1.5% (Bautista-Baños *et al.*, 2003). Sin embargo, a esa misma concentración de quitosano (1.5%) se le atribuye un efecto fungicida en el crecimiento de *B. cinerea*, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler f. sp. *lycopersici*, *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* asociado al grado de desacetilación del quitosano (El Ghaouth, *et al.*, 1992^c). Por otra parte, Hirano y Nagao (1989) encontraron que el crecimiento

micelial de 18 hongos fitopatógenos se inhibió en presencia de quitosano, dependiendo del grado de polimerización de la cadena. Adicionalmente, en *B. cinérea* y *R. stolonifer* se ha observado la salida de aminoácidos y proteínas del interior de la célula, manifestándose este efecto durante la hora siguiente de aplicarse el tratamiento. Observaciones microscópicas reflejaron que las hifas redujeron su tamaño y mostraron una forma anormal, evidenciándose un crecimiento aéreo anormal de las mismas (El Ghaouth *et al.*, 1992^c). No obstante, la germinación de las esporas y la elongación del tubo germinativo sólo se afectaron con altas concentraciones de quitosano (6 mg/ml) (El Ghaouth *et al.*, 1992^a).

Estudios *in situ*. En el área del manejo postcosecha son escasos los estudios realizados donde se reporten alteraciones directamente sobre el hongo fitopatógeno o las alteraciones que suceden en la interacción quitosano-fruto. Así por ejemplo, en frutos de manzana (*Malus pumila* Mill.) tratados con quitosano al 1.2%, se observó que los conidios de *B. cinérea* exhibieron una forma anormal, inhibiéndose la germinación de los mismos y el crecimiento micelial (Du *et al.*, 1998). El Ghaouth *et al.* (1994) con el apoyo de la microscopía de transmisión, observaron cambios ultra estructurales y citoquímicos en la interacción quitosano-*B. cinérea* en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L. cv. Bellboy), encontrando que las hifas tratadas con quitosano presentaban varios grados de desorganización celular que se manifestaban desde perder la consistencia de la célula hasta la degradación del protoplasma, mientras que en los tratamientos donde no se aplicó este biopolímero las hifas conservaron su apariencia normal. En estudios posteriores, se analizaron otros aspectos bioquímicos y citoquímicos en el mismo modelo de estudio, corroborándose que el quitosano induce severos daños citológicos en las hifas invasoras, similares a los reportados anteriormente (El Ghaouth *et al.*, 1991).

Estudios bajo condiciones de invernadero se demostró el para combatir *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, en un suelo limo arenoso pH= 6.0, materia orgánica 1% (w/w) proveniente de un campo de cacahuate (*Arachis hipogea* L.) infestado, la quitina se añadió al suelo en concentraciones de 0.5 – 4.0% (w/w) y se dejó descomponer por tres semanas, enseguida se sembró el suelo con semillas de calabacín “summer crookneck” (*Cucurbita pepo* L.). Después de seis semanas de crecimiento las plantas se examinaron para determinar el grado de nodulación causado por el nematodo, donde las enmiendas al 1% o más eliminaron el agallamiento de las raíces. También, los tratamientos de 0.5% y 2.0% resultaron en plantas más altas y con tallos más pesados que las de suelos sin tratamientos o que las de los que recibieron el polímero en concentración de 4%. (Mian *et al*, 1982).

Los resultados obtenidos en un bioensayo bajo condiciones *in vitro* muestran, que el testigo químico (Furadán 350 L), Quitosano 1000, Quitosano 2000, Quitosano-*L. iridentata* 1000/1000 y Quitosán-*L. tridentata* 2000/1000 fueron los mejores tratamientos por mostrar un contundente efecto, ya que reportaron un 100% sobre la inmovilización de los J2 de *N. aberrans*, siendo estadísticamente iguales entre sí, seguidos por Quitosano 500 con un 73.82% de inmovilidad a las 72 hr después del lavado con agua destilada; por el contrario, los tratamientos que menos efecto mostraron en contra del nematodo falso agallador fueron, además del testigo absoluto, *L. tridentata* 500 y *L. tridentata* 1000 con tan solo un 23.20, 14.16 y 22.42 % respectivamente de inmovilidad de los juveniles. (Peña Rodríguez, 2003)

Otro experimento determinó la efectividad de las enmiendas (quitina, semilla de ajonjolí, gallinaza y semilla de mucuna) aplicadas al suelo sobre las poblaciones de nemátodos fitoparasíticos en suelo y raíz. Se observó una disminución ($\alpha=0.05$) en la población de

nemátodos fitoparasíticos en el suelo de plantas tratadas con enmiendas a base de quitina. (Morales, 2006)

Otro estudio conducido bajo condiciones *in vivo*, demostro que el uso de quitosano en concentraciones de 0, 50, 100 y 200g como alternativa ecologica aplicada en macetas como unidad experimental con capacidad de 1500 g de suelo donde se trasplanto tomate “Floradel”, el cual fue inoculado con 5000 huevecillos del nematodo *Meloidogyne incognita*, demostro reducir el índice de poblacion de J2 en 1500 cm³ de suelo, de manera similar se redujo el numero de huevecillos presentes en el suelo utilizado como unidad experimental al termino de experimento (por cada 1500cm³ de suelo; el porcentaje de agallamiento se redujo en 3.3±1.0%, 3.2±1.0%, 1.0±0.5%, y 1.0%±0.6% en todos los tratamientos para 0, 50, 100 y 200g de quitina respectivamente (Ladner, *et al.*, 2008).

5.5 Modo de Acción en nematodos.

El uso de quitosano en el control de nematodos fitopatógenos se conoce desde hace tiempo (Mankau y Das, 1969) existiendo productos que pueden ser utilizados con este propósito como Clandosan, Biolizer NC, Eco-Poly, Biorend, etc. Estos autores consideran que el mecanismo de acción de la quitina esta basado en el incremento de microorganismos quitinolíticos que se alimentan de ella, y una vez consumida la quitina agregada, pasan a consumir la quitina de otras fuentes como nematodos y sus huevos (Rodríguez- Kabana *et al.*, 1987). Sin embargo considerando la composición de la cutícula y la presencia de enzimas quitinolíticas, proteolíticas y colagenolíticas, parece indicar que el quitosano juega un papel directo en la degradación de la cutícula de los nematodos. Trabajos recientes demuestran que la mayor actividad fungicida (Xu *et al.*, 2007) e insecticida (Zhang y Tan, 2003). Las diferencias en respuesta de los fitopatógenos a concentraciones altas o bajas de quitosano, hace pensar que

este puede actuar como biocida por diferentes mecanismos bioquímicos (Szczeponik *et al.*, 2006) lo que complica el entendimiento de sus mecanismos de acción. La actividad proteolítica y collagenolítica pudiese explicar la inactividad de las larvas y el efecto en la inhibición de la incubación de las masas de huevos de nematodos fitoparasíticos (Galper *et al.*, 1990).

El quitosano es más soluble y presenta mejor actividad antimicrobiana que la quitina debido a la carga positiva del C-2 del monómero de glucosamina que se forma a valores de pH por debajo de 6. La actividad antimicrobiana del quitosano sólo ocurre cuando el biopolímero se encuentra en medio ácido; debido a esto último las soluciones stock del presente experimento se prepararon con ácido acético glacial al 99%, asimismo el efecto antimicrobiano varía con respecto al peso molecular, grado de desacetilación, concentración y pH del medio, sin embargo se han propuesto diferentes mecanismos de acción:

a) Interacción entre las cargas (+) del quitosano y las cargas (-) de la pared celular de los microorganismos en el caso de nematodos constituida de una capa de lípidos, lo cual puede ocasionar una degradación de proteínas y otros constituyentes intracelulares, o bien, alteraciones en la permeabilidad de la pared celular; éste último aspecto se ha relacionado a un incremento en la permeabilidad de los lípidos de la membrana de la célula, ocasionando la muerte a través de la pérdida de materiales esenciales (Chan *y col.*, 2001; Fang *y col.*, 2001).

Otro mecanismo propuesto se basa en la inhibición del crecimiento de microorganismos a través de la capacidad del quitosano para quelar selectivamente trazas de metales que son importantes para la célula.

b) Activación de mecanismos de defensa en células huésped, los cuales se relacionan con la reducción de aflatoxinas, la inducción de fitoalexinas y compuestos fenólicos, y el incremento en la producción de enzimas quitinasas, quitosanasas, glucanasas o fenilalanina amoníaco-liasas

c) Penetración del quitosano al interior de la célula microbiana e interacción entre el biopolímero con el DNA, inhibiendo la síntesis de RNA mensajero, proteínas y enzimas (Vander y col., 1998).

LITERATURA CITADA

Aballay, E. y Flores P. 2000. Nuevas alternativas para el control de nematodos fitopásitos. *Aconex*. 67:5-8.

Abd-El-Morty H., F. W. Raid y S. El-Eraki. 1993. Effect of single and mixture of antagonistic fungi on the control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Egyptian Journal of Agricultural Research*. 17(1):91-100.

Agrios, G., N. 1996. *Fitopatología*. 2° ed. Ed. Limusa. México. pp; 696-697.

Anaya G., D. Renaud, J. O. Montilla and N. Jiménez. 2001. Control of *Meloidogyne incognita* Chiwood on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Posgrado de Agronomía. Programa Fitopatología. Decanato de Agronomía, UCLA. Apartado postal 400. Barquisimeto, Edo Lara

Anderson, C.G., de Pablo, N., y Ramo, C.R. (1977). Antarctic krill (*Euphasia superba*) as a source of chitin and chitosan. En: *Proceedings of the first international conference on chitin and chitosan*. Muzarelli, R.A.A. y Pariser, E.R. (editores). M.I.T. Sea Grant Programme, Cambridge Massachusetts. P. 54-64.

Aparicio, O. G., Márquez, M. B. Y Montes, B. R. 1989. Efecto directo de la urea y el sulfato de amonio sobre el segundo estadio larvario (J2) de *Nacobbus aberrans* bajo condiciones de laboratorio. *Memorias del XVI Congreso Nacional de Fitopatología, Montecillo, México*. 179 p.

Araya, A. y A. Cheves 1997. Efecto de cuatro nematicidas sobre el control de nematodos en banano (Mussa AAA). *Corbana* 22(47):35-48.

ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria). 2006. El cultivo de chile Mexicano, un nicho en el Mercado Estadounidense. *Claridades Agropecuarias*. 60:32

Attwood, M.M. y Zola, H. (1967). The association between chitin and protein in some chitinous tissues. *Comparative Biochemistry Physiology*. 20:993.

Austin, P.R. (1988). Chitin solutions and purification of chitin. En: *Methods in Enzymology*, 161: 403-407.

Bastidas T. C. 2006. Manejo de enfermedades en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, Culiacán Sinaloa UAS.

Bautista-Baños, S. y Bravo-Luna, L. 2004. Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento. *Revista iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 6:63-67.

Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., and Bosquez-Molina, E. 2004^a. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extraéis. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:178-186.

Bautista-Baños, S., López-Hernández, M., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C.L. 2003. Effect of chitosan and plant extraéis on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levéis and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22:1087-1092.

Baxter S. R., 2004. Molecular Weight and Degree of Acetylation of Ultrasonicated Chitosan, The University of Tennessee, Knoxville.

Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M., Ishizake, S., Suthidnham, R., and Sungpech, O. 2000. Effect of chitin and chitosan on gelling properties of surimi from barred garfish (*Hemiramphus far*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:102-108.

Benhamou, N. (1992). Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. *Phytopathology*, 82(10): 1185-1193.

Billmeyer, F.W. (1984). Textbook of polymer science. 3th edition. John Wiley & Sons, Inc., Canada.

Bird, A. F. 1979. Root - Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). Systematics, Biology and Control. Edited by Lamberti, F. y Taylor C.E. Academic Press. New York. 477 p.

Brown, R. H. and Kerry B. R. 1987. Principles and Practice of Nematode Control in Crops. Academic Press. Australia. 447p.

Brinker, F. 1993. *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (chaparral o creosote, Bush). *British Journal of Phytotherapy*. 3:10-31.

Brunner, M. P. 1967. "Jicamilla del chile causada por un nuevo nematodo y obtención de fuentes de resistencia". *Agrociencia*. 2:92-98.

Castillo, P. G. 1988. Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944, en raíces de *Capsicum annum* y *C. baccatum*. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 65 p.

Carrillo-Fasio, J. A., R. S. García-Estrada., R. Allende-Molar, I. Marquez-Zequera, y J. E. Cruz-Ortega. 2000. Identificación y distribución de especies del nematodo nodulador (*Meloidogyne* spp.) en hortalizas, en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18:115-119.

- Castro, A. A. E., E. Zavaleta-Mejía., I. Cid del Prado V., y G. Zamudio V. 1990. Rotación e incorporación de *Tajetes erecta* L. para el manejo de *Meloidogyne*.
- Chan, V., Mao, H-Q y Leong, K.W. (2001). Chitosan-induced perturbation of dipalmitoyl-*glycero-3-phosphocholine* membrane bilayer. *Langmuir*, 17(12): 3749-3756.
- Cepeda S. M. 1996. Nematología agrícola, Editorial Trillas. México D.F. 305 p.
- Cid del Prado, V. I. 1993. Morphological variation and host test for Mexican populations of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Alien 1944. *Nematropica* 23:1-13.
- Cid del Prado, V., I., K. Evans, L. R. H., Manzanilla, J. C. Cristóbal y A. G. E. Franco. 1996. Evaluación de algunas estrategias para el manejo de *Nacobbus aberrans* en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. Resumen. Congreso Nacional de Fitopatología, Guadalajara, Jalisco, México.
- Cid del Prado, V. I., Manzanilla, L. R. H., Cristóbal, A. J., Franco, A. G. E. y Carrillo, F. C. 1995. Dinámica poblacional de *Nacobbus aberrans* con cultivo de jitomate, maíz y maleza. Avances de la investigación. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 178-180 pp.
- Cid Del Prado, V. I., A. T. Soto, y J. A. Hernández. 2001. Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:32-39.
- Chavarría, J y H. Irizarry. 1997. Rates, application intervals and rotation of four granular pesticide to control nemátodos and the cornweevil (*Cosmopolitas sordidus* Germar) in plantain. *J. Agric. Univ. P.R.* 81(1-2):43-52.
- Cheah, L., Page, B., and Shepherd, R. 1997. Chitosan coating for inhibition of *sclerotinia* rot of carrots. *New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science* 25:89-92.
- Christie, J. R. 1936. The development of root-knot nematode galls. *Phytopathology*. 30: 1-22 p.
- Chubachi K, M. Furukawa, S. Fukuda, S. Takahashi, S. Matsumura, H. Itagawa, T. Shimizu, A. Nakagawa. 1999. Control of root-knot nematodes by *Streptomyces* screening of root-knot nematode-controlling actinomycetes and evaluation of their usefulness in a pot test. *Japanese Journal of Nematology*. 29(2): 42-45.
- Clark, S. A. 1967. The development and life history of the false root-knot nematode, *Nacobbus serendipiticus*. *Nematropica* 13: 91-101.
- Costilla, M. A. 1985. El falso nematode del nudo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 y su relación con el cultivo de papa en el noroeste argentino. *Revta ind. agric. Tucuman.*, 62: 79-97.

Cristóbal, A. J., V. I. Cid del Prado, L. R. H. Manzanilla, M. N. Marbán, A. G. Mora y G. P. Sánchez. 2000. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad del agallamiento radical en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ocasionada por *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 30:120.

Cristóbal, A. J., V. I. Cid del Prado, L. R. H. Manzanilla, M. N. Marbán, A. G. Mora y G. P. Sánchez. 2001a. Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. *Nematropica* Vol. 31(2): 227-233

Cristóbal, A. J. 2001. Estudios epidemiológicos, alteraciones nutrimentales y estadios de sobrevivencia en el patosistema *Lycopersicon esculentum-Nacobbus aberrans*. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 90 p.

Crump, D. H. and Irving, F. 1992. Selection of isolates and methods of culturing *Verticillium chlamidosporium* and its efficacy as a biological control agent of beet and potatoes cyst nematodes. *Nematologica* 38:367-374.

Cruz, C. M. A., Zerón, B. F. y De La Jara A. F. 1987. Dispersión del nematodo fitoparásito *Nacobbus aberrans* en una región agrícola entre Actopan y Progreso, Estado de Hidalgo. Memorias del XIV Congreso nacional de Fitopatología, Morelia, Michoacán. 83 p.

Dávila, M. N. Acosta, C. Betancourt y J. Negrón. 1999. Capacidad quitinolítica de hongos aislados de suelos agrícolas infestados con el nematodo nodulador (*Meloidogyne* spp.) en Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P. R.* 83(3-4): 189-199.

De Santiago De S. A. 1985. Control químico de Rematados en maíz (*Zea maíz* L) mediante tratamientos por inmersión de semillas en nematicidas sistémicos. Tesis: Ingeniero Agrónomo especialista en Parasitología Agrícola, Chapingo México.

De Leij F. A. A. M. and Kerry, R. B. 1991. The nematophagus fungus *Verticillium chlamidosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue Nematol* 14(1):157-164.

De Leij F. A. A. M. Kerry, R. B. And Dennehy, J. A. 1992. The effect of fungal application rate nematode density on the effectiveness of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 38:112-122.

De Leij F. A. A. M., Kerry, R. B. And Dennehy, J. A. 1993. *Verticillium chlamidosporium* as a biological control for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot test. *Nematologica* 39:115-126.

Diaz, G. C. 1986. Control biológico del nematodo *Meloidogyne* sp. Goeldi con el hongo *Peacilomyces lilacinus* Thom Samson en melón (*Cucumis melo* L.) a nivel invernadero. Tesis de Licenciatura del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Cocula Guerrero. 43p.

Domsch, K. H. and Gams W. 1980. Compendium of soil fungi. Vol. I. Academic Press. London. 632 p.

Doroteo, M. A. 2006 Parasitismo In vitro de cinco aislamientos de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare Evans and Gams sobre *Nacobbus aberrans* y estandarización de un método para su producción masiva. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Cuautitlan Izcali, Estado de México. 46p.

Dropkin, V. H. 1980. Introduction to Plant Nematology. Ed. Jhon Wiley. USA. 293 p

Du, J., Gemma, H., and Iwqchori, S. 1997. Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear, and kiwifruit. Journal of the Japanese Society of Horticultural Science 66:15-22.

Du, J., Hiroshi, G, and Shuichi, I. 1998. Effects of chitosan coating on the storability and on the ultrastructural changes of "Jonagold" apple fruit in storage. Food Preservation Science 24:23-27.

Eisenback, D. J. and Triantaphyllou, H. H. 1981. Root-knot Nematode: *Meloidogyne* species and races. Journal of Nematology 2: 26 -32.

Eisenback, J. D.; Hirschmann, T. H., Sasser H. J. and Triantaphyllou, C. A. 1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* species). Con una clave pictórica. International *Meloidogyne* Projec. Raleigh, North Carolina, U.S.A. Traducido por Sossa Moss.

Eisenback, J. D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Pp. 95-112. In: J. Sasser and C. Carter (eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. I, Biology and Control. North Carolina State University Graphics, Raleigh, N.C, U.S.A.

Eisenback, J. D., H. Hirschmann., J. N. Sasser, and A. C. Triantaphyllou. 1991. A guide to the Four Most Common Species of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). Plant Pathology and Genetics, North Carolina State University and the United States Agency for International Development, Raleigh, NC, U.S.A.

Eisenback, J. D. and H. H. Triantaphyllou. 1991. Root-knot nematodes *Meloidogyne* species and races. Ed. W. R. Nickle. Manual of Agricultural Nematology. Marcell Dekker, New York, pp: 191-274.

El Ghaouth, A., Añil, J, Ponnampalam, R., and Boulet, M. 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. Journal of Food Science 56:1618-1620.

El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., and Asselin, A. 1992a. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. Phytopathology 82:398-402.

- El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A., and Benhamou, N. 1992c. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research* 96:769-779.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., and Benhamou, N. 1997. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology* 12:183-194.
- FAO 2006. Consulta de Datos de Produccion Mundial y Comercio Internacional de Chile disponible en: <http://apps.fao.org/faostat>.
- Fang, S. W., Li, C. F. y Shih, D. Y. C. (1994). Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied Kumquat. *Journal of Food Protection* 56(2): 136.
- Fang, N., Chan, V., Mao, H-Q y Leong, K.W. (2001). Interactions of phospholipids bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. *Biomacromolecules*, 2(4): 1161-1168.
- Felse, P.A. y Panda, T. (1999). Studies on applications of chitin and its derivates. *Bioprocess Engineering*. 20: 505-512.
- Fox, D. L. (1973). Chitin-bound keto-carotenoids in a crustacean carapace. *Comparative Biochemistry Physiology* 44B:95
- Franco, J. Ramos, J. Oros, R. Main, G. y Ortuño, N. 1999. Pérdidas económicas causadas por *Nacobbus aberrans* y *Globodera* spp. en el cultivo de la papa en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la papa* 11:40-66
- Franco, N, F. Cid del Prado, V., Zavaleta, M.,E. y Sánchez, G., P. 2002. Aplicación de enmiendas orgánicas para el manejo de *Nacobbus aberrans* en tomate. *Nematropica* 32:113-124.
- Franco-Navarro, F., Pérez R. I. Doroteo, M. A., Vilchis, M. K., Hernández, P. M. A. González, C. B. y Miranda, D. J. 2006. Estado actual del conocimiento de *Pochonia chlamidosporia* en México. *Memorias del XXIX Congreso Nacional de Control Biológico*. Manzanillo, Colima, México.
- Franklin, M. T. 1979. Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). *Biology and Control*. Edited by Lamberti, F. y Taylor C.E. Academic Press. New York, pp: 21-35.
- Flores, C. R. 2003. Búsqueda y aislamientos de algunos hongos nematófagos para el control de *Nacobbus aberrans* Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1994 en México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México 89 p.
- Galper, S., Eli Cohn, Yitzhak Spiegel and Ilan Chet. 1990. Nematicidal effect of collagen-amended soil and the influence of protease and collagenase. *Revue Nématol.* 13 (1):67-71.

Godoy A. T. P., M. G. Yáñez J., L. R. Medina y C. Zazueta Z. 2000^a. Efecto de oxamil en semilla de calabaza (*Cucumis pepo* L.) sobre el nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) Resumen del XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. 50 p.

Godoy A. T. P., M. G. Yáñez J., F. Avendaño M., T. De J. Velásquez A. 2000^b. Comportamiento de *Meloidogyne* en el cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.) tratada la semilla con oxamil. Resumen del XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. 51 p.

Gómez, R. O., Zavaleta-M. E. y Carrillo, F. C. 1991. Efecto del cultivo e incorporación del cempazuchil (*Tagetes erecta* L.) sobre el nematodo falso agallador *Nacobbus aberrans*. Memorias del XVIII Congreso Nacional de Fitopatología, Puebla, Puebla. 161 p.

González, A. y Canto, S. M. 1993. Comparación de cinco enmiendas en el control de *Globodera pallida* en microparcels en Perú. *Nematropica* 23:133-139.

Gotlieb, D., Y. Oka, B.H. Ben-Daniel y Y. Cohen. 2003. Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* protects cucumber and tomato plants against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Phytoparasitica* 31(3):217-225.

Gray, A. F. and Soh, H. D. 1989. A nematicide seed treatment to control *Dytlienichus dipsaci* on seedling alfalfa. *Journal of Nematology*. 21(2):184-188.

Guiran, G., and M. Ritter. 1979. Life cycle of *Meloidogyne* species and factors influencing their development. Pp. 172-191. *In*: F. Lamberti and C. E. Taylor (eds.).

Guzman-Plazola, R. A., J. Jaraba N., E. Caswell-Chen, E. Zavaleta-Mejía, and I. Cid del Prado V. 2006. Spatial distribution of *Meloidogyne* species and races in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) producing region of Morelos, México. *Nematropica* 36:215-229.

Hansen, M.E. y Llanes, A. (1994). Applications of crustaceans wastes in Biotechnology. Fisheries processing: Biotechnological applications. Edited by A.M. Martin. Chapman & Hall. Londres, pp: 174-205.

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

Hernández, P. M. A. 2005. Control biológico de *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1994 mediante *Pochonia chlamydosporia* (Goddard Zare and Gams) en chile (*Capsicum annum* L.) Tesis de Licenciatura UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Cuautitlan Izcalli, Estado de México. 85 p.

Hernández, A. M., Zavaleta, M. E. 1992. Efecto de *Nacobbus aberrans* Thorne & Allen 1944, en la infección de *Phytophthora capsici* en chile *Capsicum annum*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 10:166-174

Hirano, S. (1986). Chitin and chitosan. In: Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry. Vol. A6. pp 231-232.

Hirano, S., and Nagao, N. 1989, Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry* 53:3065-3066.

Hirschman, H. 1982. Taxonomy of the Cyst and Root-knot Nematodes. Ed. *Nematology in the Southern region of the United States*. Bulletin 276. Arkansas Agricultural Experiment Station. Fayetteville, Ak. pp:54-70.

Hirsh, R. P., Atkins, D. S. Mauchline, H. T., Morton, C. O. Davies, G. K. y Kerry, R. B. 2001. Methods for studying the nematophagous fungus *Verticillium chlamidosporium* in the root environment. Kluwer Academic Publishers. Great Britain. 21-30.

Hoagland, P.D., and Parris, N. 1996. Chitosan/pectin laminated films. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 44:1915-1919.

Inserra, R. N., Griffin, G. D. and Anderson, J. L. 1985. The false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. Research Bulletin 510. Utah Agricultural Experiment Station Logan. Utah. 14 p.

Jatala, P. 1979a. Review of the false root-knot nematode (*Nacobbus* spp.) report of the planning conference on developments in the control of nematode pests of potatoes. International Potato Center, Lima, Perú 1978:66-69.

Jatala, P. 1985c. En nematodo falso nodulador de la raíz. Colegio de Posgraduados, Montecillos, Estado de México, pp. 47-55

Jepson, S. B. 1987 Identification of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species). International Institute of Parasitology. St. Albans. Herts, U. K. pp: 3-10.

Johnson, G. W., S. Vaupel, F. R. Kegel and M. Cadet. 1995. Crop and farm diversification provide social benefits. *California Agriculture*. 49(1): 10-16.

Karssen, G., and T. Van Hoerselaar. 1998. Revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1982 (Nematoda: Heteroderidae) in Europe. *Nematologica* 44:713-788.

Kendrick, B. 2000. The fifth kingdom. 3a. ed. British Columbia, Canada. 374 p.

Kerry, B. R., Simon, A. and Rovira, A. D. 1984. Observations on the introduction of *Verticillium chlamidosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode *Heterodera avenae*. *Annals of Applied Biology* 105(3):509-516.

Krochta, JM., Baldwin, EA. y Nisperos-Carriedo, MO. (1994). Edible coatings and films to improve food quality. Published by Technomic Publishing Company Inc. Lancaster, U.S.A. 357pp.

Ladner, D. C., Tchounwou, P. B., and Lawrence, G. W., (2008). Evaluation of the Effect of Ecologic on Root Knot Nematode, *Meloidogyne incognita*, and Tomato Plant, *Lycopersicon esculentum*. Int J. Environ. Res. Public Health 5(2), 104-110.

Lafontaine. P.J., and Benhamou, N. 1996. Chitosan treatment: An emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Biocontrol Science and Technology 6:11 -24.

Lamberti, F. and Taylor, C. E. 1979. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) systematics, biology and control. Ed. Academic Press. London. 477 p.

Lara, M. J., Agosta, N., Betancourt, C. V. y Rodríguez R. 1996. Control biológico de *Meloidogyne incognita* en tomate en Puerto Rico. Nematropica 26: 143 - 152.

Liu, X.D., Nishi, N., Todura, S., and Sakari, N. 2001. Chitosan coated cotton fiber. preparation and physical properties. Carbohydrate Polymers 44:233-238.

Magunacelaya, J., y E. Dagnino. 1999. Nematología Agrícola en Chile. Universidad de Chile, Serie Ciencias Agronómicas N°2, Santiago, Chile. 282 p.

Mankau, R. and S. Das. 1969. The influence of chitin amendments on *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology 1: 15-16.

Manzanilla-López, R.H. 1997. Studies on the characterization and bionomics of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944 (Nematoda:Pratylenchidae), Ph. D. Thesis. University of Reading. U.K. 395 p

Manzanilla-López. Harding, S. and Evans, K. 1999. Morphometric study on twelve populations of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda:Pratylenchidae) from México and South America. Nematology 1:477-498

Manzanilla-López, R. H., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R. N., Lehman, P. S., Cid Del Prado, V. I., Souza, R. M. and Evans, K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne and Alien, 1944 (Nematode: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. Nematropica 32: 209 -232.

Marroquin A. L. M. 1980. Tratamiento a la semilla mediante nematocidas sistémicos para el control del nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.). Tesis de licenciatura, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

Marban, M. N. Y Zamudio, V. 1982. Control químico de *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita* en tomate (AGE 55 VS) de Tecamachalco Puebla. Avances en la investigación del Colegio de Postgraduados Montecillo, México. 65-67 p.

- Marbán, M.N., E.R. García, M. B. Dicklow and B. M. Zuckerman. 1992. Studies on *Paecilomyces marquandi* from nematode suppressive Chinampa soils. *Journal of Chemical Ecology*. 18(5):775-783.
- Marbán M., N. y H. J. Avila. 2004. Anti-nematode evaluations on *Meloidogyne incognita* associated with vineyards at Hermosillo, Sonora, México. In: XXXVI Annual Meeting Organization of Nematologists of Tropical America. Puerto Vallarta, Jalisco. México, 30 p.
- Mían, I. H., Rodríguez-Kabana, R. 1982. Soil amendments with oil cakes and chicken litter for control of *Meloidogyne arenaria*. *Nematropica* 12(2): 205-221.
- Montes, B. R. 1988. *Nematología Vegetal en México*. Sociedad Mexicana de Fitopatología. 158 p.
- Montoya, F. 1994. Tesis Rango de hospederos del nematodo falso agallador *Nacobbus aberrans* (Thorne 1935) Thorne y Allen 1944, en los municipios de Villa de Cos, Panuco y Guadalupe, Zacatecas. 68 p.
- Morales, R. M., 2006. Manejo de nematodo fitoparasíticos utilizando productos naturales y biológicos. Tesis de Maestría. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayaguez, pp: 33-40.
- Muzzarelli, R. A. (1977). *Chitin*. Primera Edición. Ed. Pergamon Press Gran Bretaña. p 309
- Ockerman, H. W. (1992). *Fishery by-products*. En: *Fish Processing Technology*. G.M. Hall (editor). Blackie Academic & Professional Londres. pp 155-199.
- Ortega, P. F. M. y Jaime, G. R. 1990. Respuesta de variedades de frijol pinto al ataque del nematodo agallador (*Meloidogyne incognita*). *Memorias del XVII Congreso Nacional de Fitopatología Culiacán, Sinaloa*. 58 p.
- Page, S. L. 1985. *Meloidogyne acronea*. C.I. H. Descriptions of Planta-parasitic Nematodes. Commonwealth Institute of Helminthology. St. Albans 8(114):2-3.
- Palacios, A. S. 1970. Distribución, identificación y control químico del nematodo nodulador de raíces (*Meloidogyne* spp.) causante de la "jicamilla" del jitomate en el Estado de Morelos, Tesis profesional. Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México. 89 p.
- Peña, F. R., 2003. Actividad nematicida *in vitro* de formulaciones quitosan-*L. tridentata* (D.C.) Coville contra el nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y allen, 1944. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro UAAAN.
- Papadopodou, J. and Triantaphyllou, A. C. 1982. Sex differentiation in *Meloidogyne incognita* and anatomical extence of sex reversal. *J. Nematology* 14:549-566.

Pattison, T., Martín, T. Akiew, S. Versteeg, C. and Kirkegaard, J. 2003. Can Brassicacae be used to manage root-knot nematode in tropical vegetable production Australasian Nematology Newsletter. 14(2): 16-19

Pérez, R. I. 2003. Control biológico del nematodo falso nodulador (*Nacobbus aberrans*) con el hongo nematofago *Paecilomyces lilacinus*. Memoria de instancia profesional. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 29 Xocoyucan, Tlaxcala. 53 p.

Pérez-Rodríguez I., Doroteo-Mendoza, A., Franco-Navarro, F., Santiago-Santiago, V., and Montero-Pineda, A. 2007. Isolates of *Pochonia chlamydosporia* Var. *Chlamydosporia* from México as potential biological control agents of *Nacobbus aberrans*. Nematropica. 37:127-134.

Porter, D. M., and N. T. Powell. 1967. Influence of certain *Meloidogyne* species in *Fusarium* wilt development in flue cured tobacco. Phytopathology 57:282-285.

Plascencia-Jatomea, M. Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M.M. y Shirai, K. (2003). Effect of chitosan and temperature on the spore germination of *Aspergillus niger*. Macromolecular Bioscience, 3(10): 582-586.

Rao, M. S., Reddy, P. P. and Nagesh M. 1997. Management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato by integration of *Trichoderma harzianum* with neem cake. Zeitschrift für pflanzenkrankheiten and pflanzenschutz 104(4): 423-425.

Ramírez, V. J. 1996. La solarización del suelo: un método sencillo para controlar patógenos y malas hierbas. Universidad Autónoma de Sinaloa Facultad de Agronomía. México. 68 p.

Ragnar L.O., A. Johansen, y B. Myrnes; (1990); *Process Biochemistry*; Institute of Fishers Technology Research

Reddy, B., Arul, J. Angers, P. y Couture, L. (1999). Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. J. Agric. & Food Chem., 47(3): 1208-1216.

Riegel C. and Noe J. P. 2000. Chicken litter soil amendment effects on soilborne microbes and *Meloidogyne incognita* on cotton. Plant Diseases. 84:1275-1281.

Robbins, R.T. 1982. Phytoparasitic nematodes of noncultivated habitats in Arkansas. Journal of Nematology 14:466-467.

Rodríguez- Kabana, R.; G. Morgan Jones and I. Chet. 1987. Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. Plant and Soil 100: 237-247.

Rodríguez, M. G., Gómez, L., Sánchez, L., Fernández, E., Díaz-Viruliche, L., Casanova, A., González, F. M., Cuadra, R. y Hidalgo, L. 2004. Evaluación de alternativas para el bromuro de metilo para el manejo de *Meloidogyne spp.* en cultivo de invernadero en Cuba. ONTA XXXVI Annual meeting. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 83 p.

- Román, J., X. Rivas, J. Rodríguez y D. Gramas. 1976. Chemical control of nematodes in plantains (*Musa acuminata* X *M. balbisiana*, AAB). J. Agric. Univ. P.R. 60(1):36-44.
- Rodriguez-Kabana, R., D.G. Robertson; L. Wells, P. S. King, and C. F. Weaver. 1989. Crops uncommon to Alabama for the management of *Meloidogyne arenaria* in peanut. Suppl. J. Nematol. 21:712-716.
- Rojas, M. T. y Marban, M. N. 1999. *Pasteuria penetrans* y parasitismo en *Meloidogyne incognita* y *M. arabicida*. Nematropica 28 (2): 233 – 240.
- Rosa, E. A. S. and Rodríguez, P. M. F. 1999. Towards a more sustainable agriculture system: the effect of glucosinolates on the control of soil -borne diseases. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 74 (6) 667-674.
- Ruelo, J. L. 1983. Integrated control of *Meloidogyne incognita* on tomato using organic amendments, marigolds, and nematecide. Plant Disease 67(6): 671-673.
- Saad, L. H. sundararaj, P. and Portenier, R. 2004. Chemical control of *Meloidogyne chitwoodi* on potato in Idaho. ONTA XXXVI Annual meeting. Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico. 83 p.
- Sandford, P. 1989. Chitosan: Commercial uses and potential applications. pp. 51-69.
- Sasser, J. N., 1977. Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) Journal of Nematology 9:26-29.
- Sasser, J. N. 1979. Pathogenecity, host ranges and variability in *Meloidogyne* species. Eds. F.
- Sasser, J. N., and Carter, C.C.1985.An advanced treatise on *Meloidogyne*, Vol. 1 North Caroline State University, Ed. Graphics 422 p.
- Seo, H., Mitsuhashi, K. y Tanibe, H. (1991). Antibacterial and antifungal fiber blended by chitosan. Advances in chitin and chitosan. Edited by Brine, C.J. Elsevier Applied Science. Proceedings of the 7th International Conference on Chitin Chitosan and Euchis '97, held in Lyon, France, September 3-5, 1997.
- Shahidi, E, Kamil, J.K., Jeon, Y., and Kirn, S. 2001. Antioxidant role of chitosan in a cooked cod (*Gadus Morhua*) model system. Journal of Food Lipids 9:57-64.
- Sher, S. A. 1970. Revisión of the genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944. Journal of Nematology 2: 228-235.
- Shin, Y., Min, K. y Kim, H.K. (1997). Antimicrobial finishing of polypropilene nonwoven fabric by treatment with chitosan. Advances in chitin science. Vol. II. 7th ICCS.

Shin, Y., Yoo, D.I. y Min, K. (1999). Antimicrobial finishing of polypropilene nonwoven fabric by treatment with chitosan oligomer. *J. App. Polymer Sci.*, 74: 2911-2916.

Shirai, C.M.; Guerrero, L.I.; Hall, M.G. 1996. La quitina, ocurrencia, propiedades y aplicaciones, *Ciencia*. 317-323

Shirai, C.M., 1999. Utilización de desperdicios de crustáceos para recuperación de quitina, propiedades y pigmentos por vía microbiana. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana, C.B.S.

Shirai, C.M., I. Guerrero-Legarreta, G. Rodríguez-Serrano, S. Huerta-Ohoa, G. Saucedo Castañeda y G.M. Hail; (1997); *Advances in Chitin Science*, vol 11.; eds. A. Domard, G. A. Roberts, K. M. Varum.

Shirai, C.M., 2004. Utilización de desechos de crustáceos para la obtención de quitina, quitosano, proteína y quitinazas mediante biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Iztapalapa, México.

Siddiqi, M. R. 1986. Tylenchida, Parasites of Plants and Insects. Common wealt Institute of Parasitology: Farnham Royal. pp: 307-322.

Siddiqui, I. A. and Shaukat S. S. 2003. Impact of Biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHAO and its genetically modified (GM) derivatives on penetration of *Meloidogyne incognita* in mungbean roots. *Nematología Mediterranea*. 1(31):43-45.

Simpson, B.K., Smith, J.P., Haard, N.F. (1994). Marine enzymes. *Encyclopedia of food science and technology*. New York: wiley.

Soler-Serratos, A. N. Kokalis-Burelle, R. Rodriguez-Kabana, C. F. Weaver and P. S. King. 1996. Allelochemicals for control of plant-parasitic nematodes. *Nematropica* 26:57-71.

Struszczyk, H. y Pospieszny, H. (1997). New applications if chitin and its derivatives in plant protection. En: *Applications of chitin and chitosan*. Edited by Mattheus F.A. Goosen. Technomic Publishing Co. Inc., pp: 171-184.

Szczeponek, A.; S. Mazur and J. Nawrocki. 2006. The usage of chitosan on protection of some peppermint and lemon balm pathogens. Polish Chitin Society Monograph XI. Sitio web: www.ptchit.lodz.pl/PTChit/11_24.pdf

Taylor, A. L. y J. N. Sasser. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (especies *Meloidogyne*). Proyecto Internacional *Meloidogyne*. Carolina del Norte, Estados Unidos. 111 p.

Townshend, L. J. and M. Chiba. 1987. Control of *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne hapla* and yield response of alfalfa due oxamyl seed treatments. *Journal of Nematology*. Vol. 19(4):454-458.

Vander, P., Varum, K.M., Domard, A., El Gueddari, N.E. y Moerschbacher, B.M. (1998). Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.*, 118: 1353-1359.

Van Der Laan, P. A. 1956. The influence of organic maturing on the development of potato eelworm *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica* 1:112-115.

Van Ornum, J. (1992). Shrimp waste-must it be wasted. *INFOFISH International*. 6:48-52

Velasco, V. J. 2002. Alternativa tecnológica de reciclaje de los desechos orgánicos del Colegio de Postgraduados. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 91 p.

Whapam, C. A., T. Jenkins, G. Blunden and S. D. Hankis. 1994. The role of seaweed extracts. *Ascophyllum nodosum* in the reduction in fecund of *Meloidogyne javanica*. *Fundamental and Applied Nematology*. 17(2):181-183.

Xu, J.; X. Zhao, X. Wang, Z. Zhao and Y. Du. 2007. Oligochitosan inhibits *Phytophthora capsici* by penetrating the cell membrane and putative binding to intracellular targets. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88: 167–175.

Yañez, J. G. 1997. Manejo de la marchitez (*Phytophthora capsici* Leo), agallamiento radicular (*Nacobbus aberrans* Thorne Allen) y virosis del chile (*Capsicum annum* L). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 61 p.

Young, R.J. y Lovell, P.A. (1991). En: Introduction to polymers. 2th edition. Published by Chapman & Hall. UK.

Yue, M., JENKINS, T., Blunen, M.G., Whapham, C. and Hankins, S.D.1997. The role of betaines in alkaline extracts of *Ascophyllum nodosum* in the reduction of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* infestations of tomato plants. *Fundamental and Applied Nematology* 20(2): 99-102.

Zamudio, G. V. 1987. Evaluación de la resistencia de colecciones y variedades comerciales de Tomate (*Lycopersicon* spp.) a *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 88 p.

Zamudio, G. V. Carballo, Q. A. y Marban, M. N. 1987. Gama de hospedantes y evaluación del daño de *Nacobbus aberrans* en hortalizas comerciales. Memorias del XIV Congreso Nacional de Fitopatología, Morelia, Michoacán. 84 p.

Zhang, M. and T. W. Tan. 2003. Insecticidal and fungicidal activities of chitosan and oligochitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymer* 18: 391–400.

Zhang, D. y Quantick, P.C. 1998. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. *The J. Horticultur. Sci. & Biotech.*, 76(6): 37-1.

Zavaleta, M.E. and VAN H., S. D. 1986. The effect of bacterization on *Meloidogyne incognita* (Kofoid and white) Chitwood infection. *Revista Mexicana de Fitopatología* 5(1):38 - 44.

Zavaleta-M. E., R. I. Rojas M. y M. Zavaleta M. 1990. Effect of volatiles emanated from brassicaceous (criciferous) residues on some soil-borne pathogens. pp. 118-123. In: reporton the Workshop on chemical interactions Between organisms, Santiago, Chile, International Foundation for Sciense-IFS, Stockohlm, Sweden.

Zavaleta-M. E., Villa, B. A., Vargas, H. M., Ramírez, A. S. y Gómez, R. O. 2004. Efecto de la vermicomposta en el impacto de *Nacobbus aberrans* en jitomate. ONTA XXXVI Annual meeting. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 83 p.

CAPITULO II

EFFECTO DE QUITINA Y QUITOSANO SOBRE HUEVOS Y JUVENILES DE *Nacobbus aberrans* (Tylenchida; Pratylenchidae) BAJO CONDICIONES *in vitro* e *in vivo*.

RESUMEN

En la búsqueda de alternativas a químicos sintéticos para el manejo de nematodos fitoparásitos, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto *in vitro* de los biopolímeros naturales quitina y quitosano con diferentes grados de desacetilación Q1, Q2 y Q3 como regulador del nematodo formador de falsos nódulos radiculares *Nacobbus aberrans* (Thorne 1935) Thorne y Allen, 1944. Los experimentos *in vitro* se evaluaron durante once días: la inhibición de eclosión en las masas de huevos, huevos aislados e inmovilidad durante tres días para juveniles J₂, su recuperación en agua destilada se llevo acabo posterior a las 264 horas para masas y huevos aislados, y 72 horas después de la inmersión de J₂ en soluciones de Quitina en sus tres grados de desacetilación, estos últimos se evaluaron en concentraciones de 250, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm., con nueve repeticiones cada uno, obteniendo un total de 45 tratamientos realizados en placas Corning New York® de 24 pozos como unidad experimental en cada una de las concentraciones se considero un pozo con agua y otro con acido acético como testigos absolutos este último en las mismas concentraciones que los tratamientos evaluados.

El mejor resultado *in vitro* posterior a 264 hrs en masas de huevos tratadas de *M. incognita*, fue (Q1) 2000 ppm al obtener una media mínima de eclosión de 13.3, para huevos aislados fue (Q1) 2000 ppm y (Q1) 1000 ppm, que resultaron en una media de eclosión de 0.9 y 1.5 respectivamente, en juveniles J₂ después de 72 hrs de su probable recuperación en agua destilada (Q1) 2000 ppm, obtuvo una media de inmovilidad de 186.6, comparados con los testigos (T) y

(Q0) que obtuvieron una media mínima de inmovilidad de 20.2 y 46.5 respectivamente. Con respecto al bioensayo *in vivo*, el menor índice de invasión se observó en el tratamiento 0 días (0d) obteniendo el 9.8% de invasión comparados con los testigos agua destilada (T) y ácido acético (Q0) los cuales obtuvieron el 100% y 69.9% de invasión respectivamente en plántulas tratadas.

Palabras clave: biopolímeros naturales, control, grados de desacetilación, *N. aberrans*, quitina, quitosano.

6.1 Introducción

El nematodo falso agallador *Nacobbus aberrans* (Thorne 1935) Thorne and Allen, 1944 es un nematodo fitopatógeno de gran importancia, debido a los daños que ocasiona en cultivos como chile (*Capsicum annum* L.) tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Cid del Prado 1991). Aunque también se encuentra atacando cultivos de zanahoria (*Daucus carota* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), lechuga, algunas especies del género *Opuntia*, incluso plantas de la familia Poaceae y que pueden ser una fuente de inoculo (Inserra et al., 1985). De acuerdo con Sher (1970), el género *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944, cuenta únicamente con dos especies, *N. aberrans* Thorne and Allen 1944 y *N. dorsalis* Thorne and Allen 1944.

Las poblaciones de este nematodo causan significativas pérdidas debido a la interacción con otros patógenos como hongos, virus, bacterias e incluso otros nematodos. A nivel nacional ascienden a varios millones de pesos y en varias partes del país (Valadez, 2001; Anónimo, 1999; Anónimo, 2002; Anónimo, 2005). Una de las estrategias más utilizadas en el manejo de los nematodos ha sido el uso de nematicidas, resultando efectivo (Lamberti y Taylor, 1979), no obstante su uso indiscriminado provoca que las poblaciones de *N. aberrans* se vuelvan tolerantes a éstos (Cristóbal, 2001; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007); aunado a ello, los nematicidas son productos de alto costo y en su mayoría nocivos para el ambiente y la salud humana (Reigard y Roberts, 1999). Ante la disyuntiva de controlar a los nematodos fitopatógenos, sin que ello implique el uso irracional de estos productos, el uso de quitina-quitosano se plantea como otra alternativa a su manejo, este biopolímero es capaz de actuar como un inductor de la síntesis de enzimas de defensa (por ejemplo quitinasas y glucanasas) que degradan las paredes celulares de hongos, además de otras moléculas de defensa como compuestos fenólicos, fitoalexinas y pisatina (Hirano y Nagao, 1989; El Ghaouth y col., 1991; Benhamou, 1992; Benhamou y col.,

1994; Krochta y col., 1994; El Ghaouth y col., 1997; Zhang y Quantick, 1998; Reddy y col., 1999). Además, estos biopolímeros presentan otras características deseables, son biodegradables, no tóxicos y biocompatibles para humanos y para la mayoría de los animales (Felse y Panda, 1999).

6.2 Materiales y Métodos

6.3 Zona de estudio

El inóculo de *Nacobbus aberrans*, se obtuvo de raíces (Fig.1C, D y E) colectadas en áreas infestadas principalmente en cultivos de chile (*Capsicum annum* L. cv. CM-334) localizado en el Campus Montecillos al interior del Colegio de Posgraduados (Fig.1 A), con ubicación, carretera Los Reyes-Texcoco, km 36.5, Montecillo, Estado de México, La latitud es 2240 m, el clima (García, 1981) es (Cwo) (w) b (i') (g) (Fig.1 B), esto es clima templado con lluvias en verano época seca e invierno, una temperatura promedio anual de 15.2°C y 650 mm de precipitación anual.

El experimento se llevo a cabo en dos fases, en el Laboratorio de Nematología del Campus (CP), bajo condiciones *in vitro*, y la otra fase bajo condiciones *in vivo* con plántulas de chile CM-334 susceptible a nematodos, dentro de una cámara bioclimática.

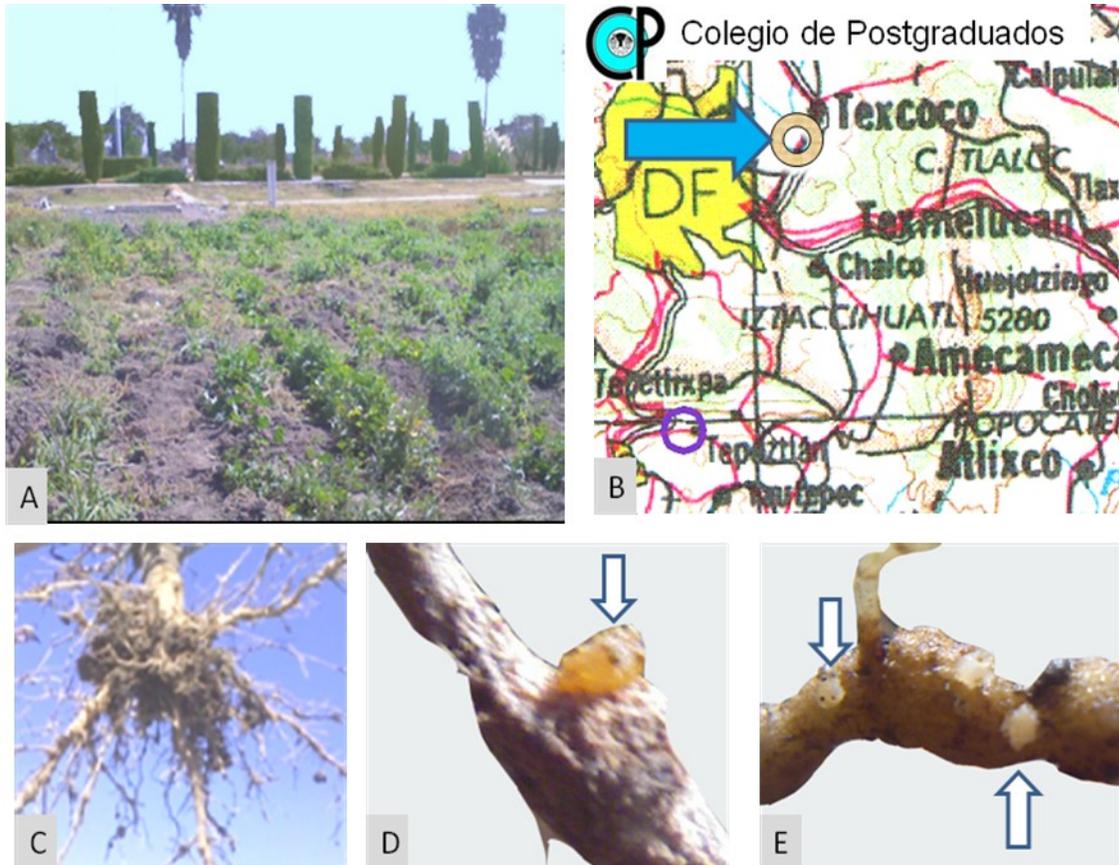


Figura 1: A) Lote infestado con el nematodo *N. aberrans*, B) Ubicación geográfica Campus del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco estado de México, C) Selección de plantas infestadas, D) Masas de huevecillos presentes en raíces infestadas.

6.3.1 Obtención de masas de huevos

Se seleccionaron 150 plantas con raíces agalladas, colectadas en la zona de estudio, durante el ciclo agrícola otoño-invierno del año 2008, se cortaron y se lavaron con agua corriente para remover el suelo. Las masas de huevecillos se extrajeron de forma manual con el apoyo de agujas de disección del número 6, después fueron pasadas por un tamiz de 100 mallas por pulgada² (Fig.2A.) para ser colectadas eliminando el mayor contenido de materia orgánica y almacenadas en una solución de antibiótico (Captan^{MR} + 0.1% de Cloramfenicol^{MR}) (Villar-Luna, 2009) hasta obtener el total de masas mas o menos homogéneas.

El número de muestras se determinó al azar garantizando que las raíces colectadas en cada una de las muestras presentaran la sintomatología que ocasiona este nematodo, tomando en consideración la etapa de cosecha que se tenía programado en el lote infestado, se tomaron 75 muestras (cada muestra constituida por dos raíces con agallas).

6.3.2 Obtención de huevos aislados

Una vez obtenidas las masas (Fig.2B), se desinfestaron con antibiótico a baja concentración (0.1% Cloramfenicol^{MR} + captan^{MR}, (Villar-Luna, 2009) se colocaron de cuatro a seis masas de huevecillos en un tubo de ensaye y se mantuvieron en agitación constante de 2 a 3 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5%. Se colectaron con una micropipeta, lo que permitió obtener un mayor número de huevecillos a diferencia de la técnica utilizando la pipeta Pasteur, (Nitao *et al* 1999). La materia orgánica se dejó asentar durante 30 segundos, tiempo suficiente para que los huevos se liberaran de la matriz gelatinosa (Fig.2C). Los huevos aun en suspensión fueron pipeteados sobre un tamiz estéril de 200, y 500 mallas (25 µm tamaño de poro), se lavaron con 300 ml de agua destilada durante un periodo de 5 minutos. Los huevos aislados fueron retirados del último tamiz con 10ml de agua estéril y colocados en un vaso de precipitado (Fig.2D). Se estimó el número de huevos por mililitro usando un microscopio estereoscópico (Hussey y Barker, 1973, Nitao, *et al.* 1999; Taylor y Sasser, 1975).

6.3.3 Obtención de juveniles infectivos (J₂)

Se utilizaron cajas de petri estériles en las cuales se colocó una malla de metal, sobre esta una tela de seda cortadas en cuadrículas de 10x10cm, donde se colocaron las masas de huevecillos previamente desinfestadas e incubadas a una temperatura de 28°C ± 1°C, agregando diariamente agua destilada estéril para evitar la pérdida de humedad en la incubadora (Villar-Luna, 2009).

Cada tercer día se realizó la colecta de juveniles eclosionados en vasos de precipitados (Fig.2E) y conservados a temperatura de 4°C hasta obtener el número de J₂ necesario. La desinfección y ensayos fueron conducidos bajo esterilidad en una campana de flujo laminar (Fig.2F).

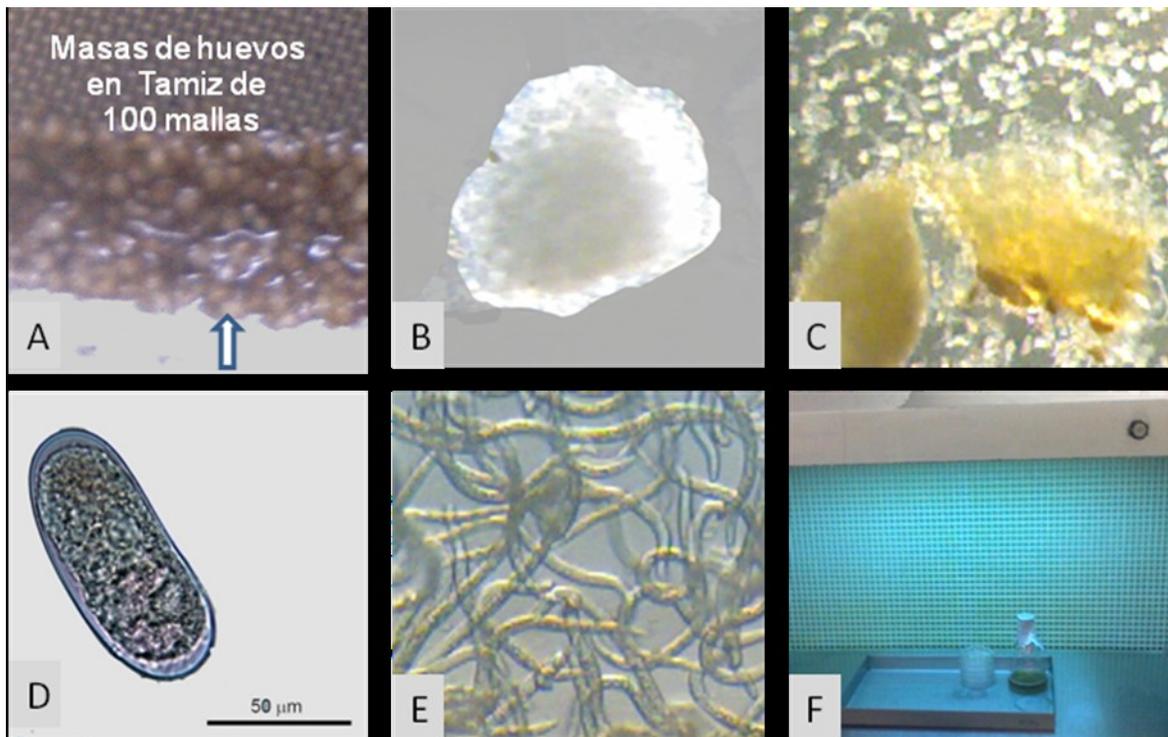


Figura 2: A) Masas obtenidas en tamiz de 100 mallas, B) selección de masas homogéneas, C) Liberación de huevos de la matriz gelatinosa, D) Huevo aislados, E) Juveniles eclosionados F) Desinfección en una campana de flujo laminar

6.3.4 Preparación de las soluciones stock quitina-quitosano

El quitosano purificado fue proporcionado por la Dra. C. Keiko Shirai Matsumoto del departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. De acuerdo a determinaciones previas los tres grados de acetilación de este producto fueron: Q1=

KDA=100 con una solubilidad del 94.5%, Q2= Quitina KDA=55 con una solubilidad del 47.25% y Q3=Quitina KDA=27 con una solubilidad del 25.5%. Para preparar las soluciones stock de quitina-quitosano (1%, w/v) se peso la hojuela de los materiales en una balanza granataria marca OHAUS® modelo Scout-pro, 2grs de Q1(2000 ppm), 1gr de Q₂ y 0.54grs de Q₃, se disolvieron en 0.5% (v/v) de ácido acético, es decir se tomaron 5.0 ml de ácido acético glacial al 99.9% disuelto en 95 ml de agua destilada estéril, y se aforo cada solución a 1L, 0.5L y 0.250L respectivamente, lo anterior para obtener las soluciones stock a 2000 ppm (Du *et al.* 1997); se mantuvieron bajo agitación magnética por 24 horas, la solución resultante se filtro a vacío sobre papel Whatman del número 4, el p.H., se ajusto a 5.6 agregando NaOH al 1N, con un potenciómetro marca CONDUCTRONIC®, modelo P.H 20. Las soluciones stock se esterilizaron a 121 ° C durante 20 minutos y las concentraciones (250, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm) se obtuvieron por dilución con agua destilada (Romanazzi *et al*, 2002). La aplicación de cada uno de los tratamientos se llevo a cabo con una micropipeta (EPENDORF®) agregando 1.5 ml de las concentraciones en pozos de placas Corning® con veinticuatro cavidades.

6.3.5 Bioensayo *in vitro* 1. Efecto de Quitina-Quitosano para inhibir la eclosión de masas de huevos

Obtenidas las masas de huevos se realizo un primer experimento, se evaluo Q1, Q2, Q3 en cinco concentraciones (2000, 1500, 1000, 500 y 250 ppm) , así como Q0 (Testigo acido acético) y T (Testigo absoluto). Se realizaron observaciones durante 11 días (Peña-Rodríguez, 2003) para darle seguimiento a la variable eclosión. Lo anterior fue conducido en placas de cultivo de tejidos estéril de 24 pozos (Corning, New York®). Cada pozo tiene una capacidad de 2 ml aproximadamente, por lo que se agrego 1.5 ml con una micropipeta de precisión para evitar derrames, adicionando 2 masas de huevos a cada uno de los pozos utilizados en los tratamientos

con 9 repeticiones. Obteniendo así 135 pozos utilizados con un total de 270 masas de huevos evaluados.

6.3.6 Bioensayo *in vitro* 2. Efecto de Quitina-Quitosano para inhibir la eclosión de huevos aislados

Obtenidos los huevos aislados por medio de la técnica descrita anteriormente se desarrollo un segundo experimento donde se evaluaron cinco tratamientos Q1, Q2 y Q3 con cinco dosis (2000, 1500, 1000, 500, y 250 ppm) mas un testigo consistente de acido acético y un testigo absoluto (agua destilada). Se realizaron observaciones y conteo durante 11 días (Peña-Rodríguez, 2003) para darle seguimiento a la variable eclosión. Lo anterior fue conducido en placas de cultivo de tejidos estériles de 24 pozos (Corning, New York®). Cada pozo tiene una capacidad de 2 ml aproximadamente, por lo que se agrego 1.5 ml con una micropipeta de precisión para evitar derrames, adicionando 200 huevos aproximadamente previo al conteo en 100 μ L, lo anterior correspondientes a cada uno de los tratamientos con 9 repeticiones, utilizando 15 placas de cultivos de tejidos como unidad experimental obteniendo así 135 pozos utilizados con un total de 27,000 huevos evaluados.

6.3.7 Bioensayo *in vitro* 3. Efecto de Quitina-Quitosano para evaluar la propiedad nematocida o nematostatica de larvas J₂.

Obtenidas las larvas J₂, se desarrollo un tercer experimento donde se evaluó los diferentes tratamiento a base de quitina en tres gados desacetilado; Q1, Q2 y Q3 a 2000, 1500, 1000, 500, y 250 ppm, así como un (Q0) Testigo acido acético y (T) Testigo absoluto. Se realizaron observaciones posteriores a las 24hrs de realizada su inmersión para evaluar su inmovilidad; la recuperación de las larvas en agua destilada se evaluó posterior a las 72 hrs del tratamiento. El

experimento se realizo en placas de cultivo de 24 pozos (Corning, New York®). En cada pozo se agrego 1.5 ml de la solución de quitosano mas 200 ± 20 nematodos. Se conto con nueve repeticiones por tratamiento.

Al termino de la preparación de los diferentes tratamientos, sobre masas de huevos, huevos aislados y sobre J₂ se procedió a introducirlos en una incubadora marca PRESICION® regulada con una temperatura de 28°C ±1°C, por un periodo de tiempo de 24 hrs; transcurrido el tiempo de exposición, se realizo un lavado con agua destilada para permitir una posible recuperación del efecto de las formulaciones (Q1, Q2, Q3). El lavado de las masas de huevos y huevos aislados se realizo a las 264hrs y en el caso de los J₂ a las 72 hrs después de la aplicación de los tratamientos.

6.3.8 Bioensayo 4 *in vivo*. Efecto de Quitosano en la interacción nematodo-planta para inhibir la invasión de J₂

Obtenidas las larvas J₂ en la forma descrita con anterioridad se desarrollo un cuarto experimento, se evaluaron cuatro tratamientos a base de quitosano, se seleccionó la dosis con la que se obtuvo un mejor resultado en los bioensayos *in vitro*. La Q1= Quitosano KDA=100 con una solubilidad del 94.5%, se evaluó a 2000 ppm, a los 0, 3, y 5 días así como un (Q0) Testigo acido acético y (T) Testigo absoluto. La prueba se llevo a cabo en una cámara bioclimática a temperatura 28°C ±1°C, con un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 de oscuridad y una intensidad luminosa de 6768 lux (luz fluorescente) (Fig.3E). La unidad experimental consistió en una caja de petri de 60 mm de diámetro que contenía peat-mos (Fig.3C) como sustrato, en cuyo interior se coloco una planta que presentaba entre cuatro y cinco hojas verdaderas de chile *Capsicum annuum* CM-334, estas fueron inoculadas con 2000 J₂ de *N. aberrans* en la base del tallo (Villar-Luna y col,

2009) (Fig.3D), a los 0, 3 y 5 días posteriores a su tratamiento con Quitosano a 2000 ppm. Se mantuvieron en observación constante durante 21 días, periodo de tiempo después del cual se realizó tinción con fucsina acida para realizar conteo de la invasión de juveniles (Prasad and Webster, 1967).

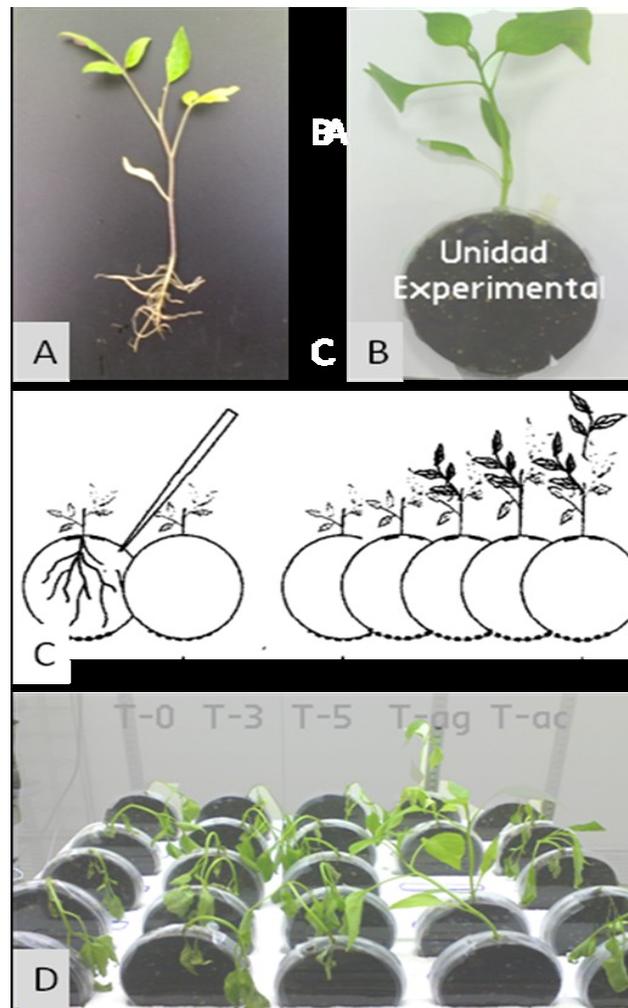


Figura 3: A) Plántula susceptible a nematodos, B) Caja Petri como unidad experimental, C) Inoculación de J_2 *N. aberrans*, en la unidad experimental y D) Incubación de plántulas tratadas en cámaras bioclimáticas.

Técnica de tinción de raíces con fucsina acida

Las raíces fueron procesadas con esta técnica para realizar el conteo de larvas J_2 , en la invasión de raíces, la cual se basa en el uso de Fucsina-Acida (3.5grs de fucsina, 250ml de ácido acético y

750ml de agua destilada (Byrd et al., 1983, citado por Barker et al., 1985) consiste en la tinción de raíces con color rojo que facilita la disección y observación de hembras adultas y larvas que se encuentran en el cilindro vascular de dicho órgano.

6.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de las fuentes de variación, tratamientos, concentraciones y las interacciones respectivas, fueron determinados mediante análisis ANOVA con un intervalo de confianza del 95%; las diferencias estadísticas entre las medias fueron comparadas utilizando la prueba de rangos múltiples Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (RGWQ), este último más potente que la prueba de Tukey ($P \geq 0.05$) (ver sección de Anexos). El programa estadístico empleado fue SAS Institute. 2002. User' guide. The SAS System software for Windows release 9.0. SAS Institute, Cary N.C. USA.

6.5 Resultados

6.5.1 Identificación del nematodo

Las muestras colectadas en la zona de estudio corresponden a *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen, población de Montecillo, Estado de México (Fig.4 A).

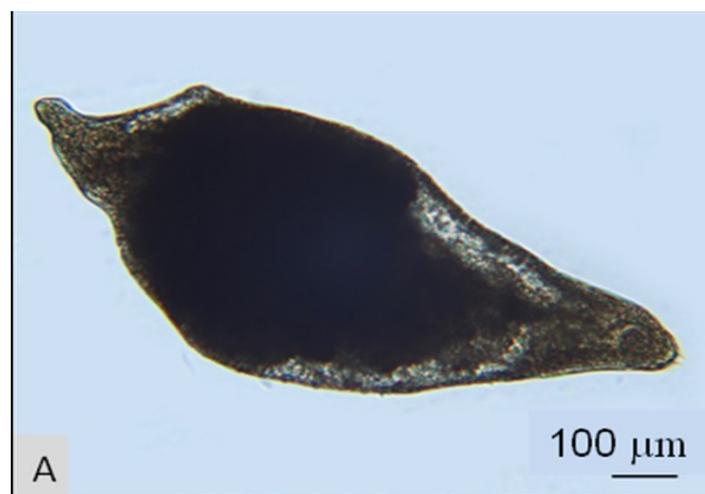


Figura 4: A) Hembra del nematodo *N. aberrans*, Montecillo, Edo. de México.

6.5.1 Efecto de la quitina quitosano en la eclosión de huevecillos

6.5.3 Masas de huevecilos.

En el cuadro 1 se muestra la información obtenida sobre eclosión de masas de huevosa las 24 hrs de tratamiento. Al realizar el análisis factorial se advierte que la respuesta a las 24 hr es similar entre tratamientos. En los bioensayos 8, 5 y 4 se obtuvo una media mínima de eclosión de 1.4, 2.8 y 4.5 respectivamente, las cuales fueron estadísticamente iguales ($P > F 2.45$). Posterior a su recuperación a las 264 hrs en agua destilada, los mejores tratamientos con una media menor de eclosión fueron Quitosano 2000 y Quitosano 1500 ppm, con un 16.5 y 17.7, respectivamente, mientras que en nuestro testigo absoluto (ensayo 21) y testigo ácido acético (ensayos 16-20) se obtuvo una media máxima de eclosión de 174.3 y 175 respectivamente. Observándose un efecto reducido en la inhibición de eclosión para las masas de huevos tratados de *N. aberrans*.

Cuadro 1. Bioensayo 1 *in vitro*. Comparación de medias de eclosión de masas de huevecillos en la interacción de tratamientos evaluados de *N. aberrans*

Ensayo	Tratamiento	Dosis ppm	1 ^{er} Bioensayo		2 ^o Bioensayo	
			Media 24 hr	Media 264 hr	Media 24 hr	Media 264 hr
1	Q1	250	10.6 abc	99 cd	6.6 ab	94 cd
2		500	23.5 abc	119.3 de	8.6 ab	125.2 de
3		1000	12.3 abc	79.3 abc	9.2 ab	92.7 bcd
4		1500	4.5 ab	17.7 a	7 ab	27 ab
5		2000	2.8 ab	18.1 a	1.6 a	16.5 a
6	Q2	250	16.7 abc	57.6 abc	9.7 ab	59.3 abc
7		500	7 ab	59 abc	12.3 ab	70.6 abcd

8		1000	1.4 a	39.8 ab	1.6 a	46.8 abc
9		1500	12.2 abc	50.8 abc	6.3 ab	69.7 abcd
10		2000	13.6 abc	38.3 ab	9.4 ab	70.8 abcd
11	Q3	250	13.7 abc	49.2 abc	10.7 ab	76.5 abcd
12		500	19.4 abc	79.3 abc	11.1 ab	74.6 abcd
13		1000	32.4 bc	75.6 abc	26.5 abc	57.3 abc
14		1500	25.7 abc	36.3 ab	18.6 abc	40.1 abc
15		2000	25.5 abc	38.8 ab	17.5 abc	44.7 abc
16	Q0	250	37.6 c	174.3 e	26.2 abc	202.2 f
17		500	16.6 abc	83.6 abc	21.6 abc	99.3 cd
18		1000	27.7 abc	100.8 cd	25.2 abc	68.4 abcd
19		1500	19 abc	49.5 abc	25.2 abc	53 abc
20		2000	15.5 abc	63.3 abc	34.2 bc	54.5 abc
21	Testigo	Agua	38.5 c	175 e	39.7 c	157 ef

Medias seguidas por letra igual, son estadísticamente iguales entre sí (RGWQ, $\alpha = 0.05$)

6.5.4 Huevecillos aislados.

Efecto del quitosano en la eclosión de huevos aislado. Con respecto a la eclosión de huevos aislados de *N. aberrans*, posterior a las 24 hrs, los tratamientos con menor eclosión fueron Q1, Q2 y Q3 en todas sus concentraciones ya que estadísticamente son iguales ($\alpha = 0.05$), obteniendo una media mínima de eclosión de cero (0.0) y una máxima de 6.5, comparado con el testigo en ácido acético de 20.4 y el testigo en agua destilada de un máximo de 23.2. Posterior a las 264 hrs después de la recuperación con agua destilada los tratamientos con una menor eclosión fueron Quitosano (Q1) 1500 ppm, y Quitosano (Q1) 250 ppm, obteniendo una media mínima de 0.7 y 1.1 respectivamente.

Cuadro 2. Bioensayo 2 *in vitro*. Comparación de medias de eclosión de huevos aislados en la interacción de tratamientos evaluados de *N. aberrans*

Ensayo	Tratamiento	Dosis ppm	1 ^{er} Bioensayo		2 ^o Bioensayo	
			Media 24 hr	Media 264 hr	Media 24 hr	Media 264 hr
1	Q1	250	0.0 a	8.7 ab	0.2 a	1.1 a
2		500	0.4 a	8.5 ab	0.2 a	2.4 bc
3		1000	0.0 a	1.8 a	0.2 a	7.2 bcd

4		1500	0.1 a	0.7 a	0.2 a	7.3bcd
5		2000	0.0 a	3.4 ab	0.3 a	7.4 bcd
6	Q2	250	3.3 a	22.1 de	0.7 a	8.7 bcd
7		500	1.6 a	16.6 cd	1.5 a	9.2 bcd
8		1000	2.1 a	6.3 ab	2 a	10.5 bcd
9		1500	0.0 a	2.1 a	2 a	12.6 bcd
10		2000	0.0 a	14 abc	2.4 a	12.8 bcd
11	Q3	250	2.4 a	11.7 abc	3.3 a	12.8 bcde
12		500	5.7 ab	13.4 abc	4.1 a	13.1 cde
13		1000	0.4 a	7.8 ab	4.3 a	14.6 def
14		1500	0.0 a	4.4 ab	6.5 a	15.7 defg
15		2000	0.0 a	23.1 de	5.4 a	16 defg
16	Q0	250	14.4 b	31.2 e	14.1 b	16.2 defg
17		500	14.1 b	16.8 cd	16.2 ab	16.8 defg
18		1000	12.2 bc	16.3 cd	16.8 ab	18.6 defg
19		1500	14.1 b	16.2 cd	19.1 ab	23.4 efg
20		2000	13.7 b	24.2 de	20.4 ab	25.3 fg
21	Testigo	Agua	18.1 b	29.6 e	23.2 b	27.2 g

Medias seguidas por letra igual, son estadísticamente iguales entre sí (RGWQ, $\alpha = 0.05$)

6.5.5 Efecto de quitina quitosano en la inmovilización de estadios juveniles J₂.

Efecto nemastático o nematocida se observa en el cuadro 3, la inmovilización de J₂ posterior a las 24 hrs de tratamiento, se observó que los tratamientos Quitosano (Q1) 2000 ppm, y Quitina (Q3) 2000 ppm, indujeron una media de inmovilidad mayor entre 16.7 y 13.1 respectivamente, mientras que posterior a 72hrs después de su probable recuperación en agua destilada los tratamientos con una mayor inmovilización fueron Q1, Q2 y Q3 en todas sus concentraciones ya que se comportaron estadísticamente iguales ($\alpha = 0.05$), mientras que en la segunda fecha de evaluación la formulación de Quitosano (Q1) 2000 ppm, obtuvo una media mayor de inmovilización en un 176.8, seguida por (Q2) 2000 ppm, y (Q3) 1500 ppm, con una media de inmovilización de 147.1 y 145.1 respectivamente, lo que se deduce en una reducción de la actividad de juveniles de *N. aberrans*.

Cuadro 3. Bioensayo 3 *in vitro*. Comparación de medias de inmovilidad de J₂ en la interacción de tratamientos evaluados de *N. aberrans*

Ensayo	Tratamiento	Dosis	1 ^{er} Bioensayo		2 ^o Bioensayo	
			Media 24 hr	Media 72 hr	Media 24 hr	Media 72 hr
1	Q1	250	2.0 def	148.1 a	0.7 f	137.6 bc
2		500	0.5 def	137.2 a	1.2 f	130.8 bc
3		1000	0.5 def	142.0 a	0.5 f	124.5 bc
4		1500	0.1 b	147.7 a	17.8 a	125.2 bc
5		2000	0.0 a	145.8 a	16.7 ab	176.8 a
6	Q2	250	0.3 c	143.2 a	12.8 bc	136.1 bc
7		500	0.1 c	129.3 a	10.0 cd	109.8 bc
8		1000	0.2 c	144.1 a	13.6 ab	89.2 bcd
9		1500	2.8 ef	141.4 a	2.6 ef	140.5 b
10		2000	6.5 ef	144.1 a	0.2 f	147.1 a
11	Q3	250	0.4 d	144.6 a	6.7 de	122.3 bc
12		500	2.1 def	144.2 a	0.3 f	127.7 bc
13		1000	0.4 de	143.1 a	5.0 ef	143.1 a
14		1500	2.2 def	142.2 a	2.4 ef	145.1 a
15		2000	13.1 ef	145.0 a	0.3 f	145.0 a
16	Q0	250	6.1 ef	79.1 a	0.1 f	88.0 bcd
17		500	13.3 ef	51.8 b	0.6 f	73.3 bcd
18		1000	3.0 ef	58.8 b	0.1 f	67.8 bcd
19		1500	18.6 ef	61.8 b	0.2 f	57.1 d
20		2000	11.8 ef	67.6 b	0.5 f	61.7 cd
21	Testigo	Agua	24.1 f	27.1 b	0.3 f	9.1 e

Medias seguidas por letra igual, son estadísticamente iguales entre sí (RGWQ, $\alpha = 0.05$)

Efecto de la penetración de J₂ en plántulas de chile. Los datos obtenidos de las variables de respuesta, de los bioensayos *in vivo*, fueron sometidos a un análisis de varianza en un modelo estadístico bloqueo al azar generalizado, así como a la Prueba de rango múltiple Ryan-Einot-Gabriel-Welsch para compara el porcentaje de invasión en la raíz de plántulas inoculadas con 2000 estadios infectivos J₂.

6.5.6 Efecto de quitosano (Q1) 2000ppm, en la inhibición de invasión de estadios juveniles J₂ en plantulas.

En el cuadro 4 se muestran los resultados de la invasión de J₂ en plántulas tratadas, Cuando se aplico quitosano (Q1, 2000 ppm) y J₂ al mismo tiempo, cero días (0d), se observo una baja invasión de la raíz por *N. aberrans*. Los tratamientos restantes, inoculación de J₂ a los tres y cinco días no mostraron diferencias estadísticas (PrF= 0.0001). Con respecto a los testigos acido (Q0) y testigo agua (T) obtuvieron un 100% y 49% de invasión respectivamnete

Los resultados favorables en la reducción de la invasión de J₂ que se obtuvieron en el tratamiento a los cero días (0d), se deben quizás al tiempo de exposición del quitosano y J₂ en el primer día; es decir el día que se realizo tanto el trasplante como la aplicación de quitosano e inoculación de 2000 larvas de J₂ de *N. aberrans*, lo cual coincide con los resultados observados en los bioensayos *in vitro* sobre este estadio juvenil.

Cuadro 4. Bioensayo 4. Comparación del % de invasión de J₂ de *N. aberrans* en plántula de los tratamientos evaluados en concentración de 2000ppm.

Tratamiento	% de invasión	Medias	REGWQ Agrupamiento
0d	6	1.6	a
3d	33	9	b
5d	52.2	14.3	b
Q0	49	13.4	b
T	100	27.4	c

Medias seguidas por letra igual, son estadísticamente iguales entre sí (RGWQ, $\alpha = 0.05$)

6.6 Discusión.

De acuerdo con los resultas obtenidos, el mejor resultado después de 24 hrs en masas de huevecillos, se obtuvo en los tratamientos Q1 1500, Q1 2000 y Q2 2000 con una media mínima de eclosión de 4.5, 2.8 y 1.4 respectivamente, comparado con los testigos acido acético y agua destilada con una media máxima de 175 y 38.5 respectivamente: Posterior a las 264hrs de recuperación en agua destilada, el tratamiento de Quitosano (Q1) 2000 y 1500 ppm,

en el bioensayo en huevos aislados del matriz gelatinoso se obtuvo que: (Q1), (Q2) y (Q3) en todas sus concentraciones fueron estadísticamente iguales con una media mínima de eclosión de 0.0 y máxima de 17.7, respectivamente en tanto que los resultados de nuestros testigos ácido acético y agua destilada se registro una media de eclosión de 175 y 174.3., En el bioensayo sobre actividad nematicida o nemastática del quitosano a las 24hrs de tratamiento de los juveniles J₂ de *N. aberrans*, se obtuvo como mejor tratamiento al Quitosano (Q1) 2000 ppm y (Q3) 2000 ppm, con una media de inmovilización de 16.7 y 13.1 respectivamente, después de 72hrs de su recuperación con agua destilada, los tratamientos con una mejor media de inmovilización de J₂ fueron (Q1), (Q2) y (Q3) en las diferentes concentraciones ya que fueron estadísticamente iguales al final de experimento.

En relación a los tratamientos *in vivo*, el menor índice de invasión se observo a los 0 días (0d) de tratamiento debido a que obtuvo un 1.6% de invasión es decir; (inoculación de 2000 larvas J₂ + Quitosano (Q1) 2000 ppm + plántula de chile CM-334 susceptible a nematodos) este tratamiento redujo en un 98.4% la invasión de este estadio comparado con los testigos de ácido acético y agua destilada, donde se obtuvo una invasión mayor de 86.6% y 72.6% de invasión respectivamente en los puntos de crecimiento de la raíz, lo cual se evidencio al teñir con fucsina acida.

6.7 LITERATURA CITADA

Anónimo. 1999. Anuario estadístico por entidad federativa. INEGI. México. 312-313pp.

Anónimo. 2002. Anuario estadístico por entidad federativa. INEGI. México. 359-360 pp.

Anónimo. 2005. Anuario estadístico por entidad federativa, INEGI. México. 374-379 pp.

Barker, K. R. 1985. Nematode extraction and bioassays. In Barker, K. R., Carter, C. C. and Sasser N. J. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Methodology. Vol II pp 19-35. Printed by North Carolina State University Graphics. Raleigh, North Carolina. U.S.A.

Benhamou N., 1992. Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. *Phytopathology* 82, 1185-1193.

Benhamou N, Lafontaine PJ, Nicole M. 1994. Induction of systemic resistance of *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan *Phytopathology* 84, 1432-44

Cid del Prado, V. I. 1991. Determinación de razas de *Nacobbus aberrans* (Thorne 1935) Thorne and Allen, 1944 presentes en México. *Avances en la investigación del Colegio de Postgraduados, Montecillos, México.* 96-98 p.

Cristóbal, A. J. 2001. Estudios epidemiológicos, alteraciones nutrimentales y estadios de sobrevivencia en el patosistema *Lycopersicon esculentum-Nacobbus aberrans*. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 90 p.

Du, J., Gemma, H., andlwqhor, S. 1997. Effectsof chitosan coating on the storage of peach. japanese pear, and kiwifruit. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science* 66:15-22.

El Ghaouth, A., Añil, J., Ponnampalam, R., and Boulet, M. 1991. Chitosan coating effect on storability and qualily of fresh strawberries. *Journal of Food Science* 56:1618-1620.

El Ghaouth, A., Añil, J., Wilson, C, and Benhamou, N. 1997. Bíochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinérea* in bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology* 12:183-194.

Felse, P.A. y Panda, T. (1999). Studies on applications of chitin and its derivates. *Bioprocess Engineering.* 20: 505-512.

García, E. 1981. Modificación al Sistema de Clasificación Climática de Koppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autonoma de México, México, D.F. 251p.

Hirano, S., and Nagao, N. 1989. Effects of chitosan, pectic ácid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry* 53:3065-3066.

Inserra, R. N., Griffin, G. D. and Anderson, J. L. 1985. The false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. *Research Bulletin* 510. Utah Agricultural Experiment Station Logan. Utah. 14 p.

Lamberti, F. and Taylor, C. E. 1979. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) systematics, biology and control. Ed. Academic Press. London. 477 p.

Nitao, J. K.; S.L.F. Meyer and D.J. Chitwood. 1999. In vitro assays of *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glicines* for deteccion of nematode antagonist fungal compounds. *Journal of Nematology* 31(2):83-172

Krochta, JM., Baldwin, EA. y Nisperos-Carriedo, MO. (1994). Edible coatings and films to improve food quality. Published by Technomic Publishing Company Inc. Lancaster, U.S.A. 357pp.

Peña, F. R., 2003. Actividad nematocida *in vitro* de formulaciones quitosan-*L. tridentata* (D.C.) Coville contra el nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y allen, 1944. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro UAAAN. Coahuila México. 33-40p.

Perez R. I., Doroteo-Mendoza, A., Franco-Navarro, F., Santiago-Santiago, V., and Montero-Pineda, A. 2007. Isolates of *Pochonia chlamydosporia* Var. *chlamydosporia* from México as potencial biological control agent of *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*. 37:127-134.

Prasad, S. K. and Webster, J. M. 1967. Effect of temperature on the rate of development of *Nacobbus serendipiticus* in excised tomato roots *Nematologica* 13:85-90.

Reddy M.V., J. Arul, P. Angers and L. Couture. 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47(3): 1208-1216.

Reigard, J. R. And Roberts, R. J. 2000. Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticidas. Universidad de California. USA. 252 p.

Romanazzi, G, Nigro, F., Ippolito, A., Di Venere, D., and Salerno, M. 2002. Effects of pre-and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science* 67:1S62-1867

SAS Intitute. 2002. User' guide. The SAS System software for Windows realese 9.0. SAS Institute, Cary N.C. USA.

Sher, S. A. 1970. Revision of the genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 *Journal of Nematology* 2:228-235.

Taylor A.L., and J.N. Sasser. 1975. Biology, Identification and Control of root-knot nematodes. North Carolina State University Graphics. U.S.A. 111p

Valadez, L. A. 2001. Producción de hortalizas. 2a. ed. Limusa México. 298 p.

Villar-Luna E., 2009. Respuesta hipersensitva en el follaje de chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39 (1): 143-155.

Zhang, D. y Quantick, P.C. 1998. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. *The J. Horticultur. Sci. & Biotech.*, 76(6): 37-41.

CAPITULO III

EFFECTO DE QUITINA Y QUITOSANO SOBRE HUEVOS Y JUVENILES DE *Meloidogyne incognita* (Tylenchida; Meloidogynidae) BAJO CONDICIONES *in vitro* e *in vivo*.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de los biopolímeros naturales quitina y quitosano con diferentes grados de desacetilación como regulador del nematodo formador de agallas radiculares *M. incognita*, los estudios se hicieron *in vitro*, sobre la eclosión de masas de huevecillos, huevecillos completamente aislados del matriz gelatinoso, juveniles infectivos de segundo estadio (J₂) y el efecto de estos biopolímeros *in vivo*, sobre la invasión del sistema radicular de plántulas de chile (*Capsicum annum* cv. Taranto) susceptible a *M. incognita*; se colectaron 240 muestras de suelo rizosférico del cultivo. De cada muestra se obtuvieron masas de huevecillos como inóculo necesario del cual se analizó la actividad nematocida del biopolímero natural quitina-quitosano, se compararon las concentraciones de 250, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm., en tres diferentes grados de desacetilación; con nueve repeticiones cada uno, obteniendo un total de 45 tratamientos realizados en placas Corning New York® de 24 pozos como unidad experimental en cada una de las concentraciones se considero un pozo con agua destilada y otro con ácido acético como testigos absolutos este último en las mismas concentraciones de los tratamientos evaluados.

El mejor resultado obtenido con una media mínima de 13.3 a la inhibición de eclosión en masas de huevos, se obtuvo posterior a las 264 hrs de la evaluación *in vitro* del tratamiento de Quitosano (Q1) 2000 ppm, mientras que en el bioensayo en huevos aislados de la matriz

gelatinosa fue (Q1) 2000 ppm y (Q1) 1000 ppm, obteniendo así una media en eclosión de 0.9 y 1.6 respectivamente, por otro lado la inmovilización *in vitro* de los juveniles J₂ de *M. incognita*, el mejor tratamiento fue con Quitosano (Q1) 2000 ppm, después de 72 hrs de su recuperación con agua destilada, obteniéndose una media de 186.6 comparada con los testigos agua y ácido acético obteniendo una media de 20.2 y 68.6 respectivamente, estos últimos obtenidos en un análisis de varianza calculando la media máxima de inmovilización de J₂ una vez concluido el experimento.

En relación a los tratamientos *in vivo*, el menor índice de invasión se observó a los 0 días de tratamiento es decir; (inoculación de 2000 larvas J₂ + Quitosano (Q1) 2000 ppm + plántula de chile cv. Taranto susceptible a nematodos) este tratamiento obtuvo 24.7% de invasión, los tratamientos restantes, inoculados de J₂ a los tres y cinco días se obtuvo 23.1% y 35.4% respectivamente comparados con los testigos de ácido acético y agua destilada, donde se obtuvo un 69.9% y 100% de invasión en los puntos de crecimiento de la raíz.

Palabras clave: biopolímeros naturales, control, grados de desacetilación, *M. incognita*, quitina, quitosano,

7.1 Introducción

En la naturaleza se encuentra presente la quitina, un polímero de 2- acetamida-2 desoxi-glucosa (Muzarelli, 1977), sustancia orgánica más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. El quitosano, su derivado más importante, es un biopolímero lineal formado por unidades de 2-desoxi 2-amino glucosa, obtenido de la desacetilación de ésta, presenta una gran aplicabilidad comercial, algunos reportes le adjudican dos papeles biológicos a este compuesto. Primero, en concentraciones definidas, este presenta propiedades antifungales y nematocidas (Benhamou, 1992; El Ghaouth *et al.*, 1994; Lárez –Velásquez, 2008). En segundo término, este actúa como un potente elicitador, favoreciendo la resistencia de las plantas contra patógenos (El Ghaouth *et al.*, 1994; Benhamou *et al.*, 1996). A la fecha su efecto en eventos a largo plazo han sido investigados (inductor de la síntesis de fitoalexinas (Hadwiger y Beckman, 1980), formación de callosa (Köhle *et al.*, 1985), respuestas de lignificación y producción de inhibidores de proteinazas (Walker-Simmons *et al.*, 1984). Amborabe *et al.*, 2008, mencionan al quitosano como un potente inductor en la despolarización de la membrana plásmática de plantas y hongos por lo que consideran que este debe ser usado como un elicitador mas que un agente antifungal, Tratamientos curativos tendientes a reducir poblaciones de nematodos agalladores con quitina y quitosano, aun requieren ser evaluados, por lo que en la presente investigación se propone evaluar estos productos in vivo e in vitro, y determinar su potencial como alternativa para el manejo de huevos y larvas infectivas de *M. incognita*.

7.2 Materiales y Métodos

7.3 Zona de muestreo

Se utilizaron muestras de raíces de *Meloidogyne incognita* (Fig. 1 C, D, E), colectadas en áreas infestadas principalmente en cultivos de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L. cv. Taranto y Simpathy) “Bell papper” producidos bajo condiciones de invernadero tipo “casa sombra” de la Agrícola ICAPS.A.(Fig. 1A), localizada en la carretera Los Mochis Guasave Sur., Km. 1.2 colindando con la carretera internacional federal No. 15 Ejido Jiquilpan, ubicado en las siguientes coordenadas, latitud 25°47' 42.5'' longitud 108°55' 53.4'' altitud de 11 m.s.n.m, a una distancia de 9.72 kilómetros de la colonia de Juan José ríos perteneciente al municipio de Guasave Sinaloa (Fig. 1B).

El experimento se llevo acabo en el laboratorio de Nematología Agrícola, ubicado en la Escuela Superior de Agricultura Valle del Fuerte (ESAVF), dependiente de la Universidad Autónoma de Sinaloa.



Figura 1: A) Lote infestado del nematodo *M. incognita*, B) Ubicación geográfica del lote infestado de la Agrícola ICAPS.A., C) Selección de plantas infestadas, raíces con suelo para evitar perdida de masas, D) Raíces con agallas, E) Masas de huevecillos presentes en raíces infestadas

Los sitios de muestreo se ubicaron mediante un geoposicionador marca ETREX®, tomando, longitud, latitud y altura sobre el nivel del mar, para cada muestra que se colecto (Tabla-1).

Tabla 1: Ubicación de los sitios de colecta de muestras de chile infestadas con *M. incognita*.

Muestra	Cultivo chile morrón “Bell papper”	Latitud	Longitud	Altura mts
1	Var.Simpathy (naranja)	25°47'41.3''	108°55'53.7''	20
2		25°55'53.7''	108°55'54.3''	20
3		25°47'40.7''	108°55'54.4''	20
4		25°47'40.8''	108°55'54.7''	20
5		25°47'41.0''	108°55'54.9''	20
6		25°47'41.3''	108°55'54.7''	19
7		25°47'40.1''	108°55'54.8''	19
8		25°47'42.6''	108°55'54.0''	15
9		25°47'43.1''	108°55'53.7''	18
10		25°47'42.6''	108°55'53.6''	14
11	Var.Taranto (amarillo)	25°47'42.5''	108°55'53.4''	15
12		25°47'42.5''	108°55'53.6''	15
13		25°47'40.7''	108°55'52.5''	14
14		25°47'40.8''	108°55'52.6''	21
15		25°47'40.2''	108°55'52.9''	20
16		25°47'41.3''	108°55'51.8''	23
17		25°47'42.0''	108°55'51.3''	22
18		25°47'40.7''	108°55'51.6''	21
19		25°47'41.1''	108°55'51.8''	20
20		25°47'41.9''	108°55'51.7''	20

Las muestras se colocaron en bolsas de plástico de 20cm x 30cm y se mantuvieron dentro de una hielera, (10° a 15°C), se llevaron al laboratorio, y se realizo inmediatamente la extracción de masas de huevecillos.

7.3.1 Obtención de masas de huevos

Se seleccionaron 240 plantas con raíces agalladas, colectadas en la zona de estudio, durante el ciclo agrícola primavera-verano del año 2009, se cortaron y se lavaron con agua corriente para remover el suelo. Las masas de huevecillos se extrajeron de forma manual con el apoyo de agujas de disección del número 6, después fueron pasadas por un tamiz de 100 mallas por pulgada² (Fig.2A.) para ser colectadas eliminando el mayor contenido de materia orgánica y almacenadas en una solución de antibiótico (Captan^{MR} + 0.1% de Cloramfenicol^{MR}) (Villar-Luna, 2009) hasta obtener el total de masas mas o menos homogéneas.

El número de muestras se determino al azar garantizando que las raíces colectadas en cada una de las muestras presentaran la sintomatología que ocasiona este nematodo, tomando en consideración la etapa de cosecha que se tenía programado en el lote infestado, se tomaron 120 muestras (cada muestra constituida por dos raíces con agallas).

7.3.2 Obtención de huevos aislados

Una vez obtenidas las masas (Fig.2B), se desinfestaron con antibiótico a baja concentración (0.1% Cloramfenicol^{MR} + captan^{MR}, (Villar-Luna, 2009) se colocaron de cuatro a seis masas de huevecillos en un tubo de ensaye y se mantuvieron en agitación constante de 2 a 3 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5%. Se colectaron con una micropipeta, lo que permitió obtener un mayor número de huevecillos a diferencia de la técnica utilizando la pipeta Pasteur, (Nitao *et al* 1999). La materia orgánica se dejo asentar durante 30 segundos, tiempo suficiente para que los huevos se liberaran de la matriz gelatinosa (Fig.2C). Los huevos aun en suspensión fueron pipeteados sobre un tamiz estéril de 200, y 500 mallas (25 µm tamaño de poro), se lavaron con 300 ml de agua destilada durante un periodo de 5 minutos. Los huevos

aislados fueron retirados del último tamiz con 10ml de agua estéril y colocados en un vaso de precipitado (Fig.2D). Se estimó el número de huevos por mililitro usando un microscopio estereoscópico (Taylor y Sasser, 1975; Nitao, *et al.* 1999;).

7.3.3 Obtención de juveniles infectivos (J₂)

Se utilizaron cajas de petri estériles en las cuales se colocó una malla de metal, sobre esta una tela de seda cortadas en cuadrículas de 10x10cm, donde se colocaron las masas de huevecillos previamente desinfectadas e incubadas a una temperatura de 28°C ± 1°C, agregando diariamente agua destilada estéril para evitar la pérdida de humedad en la incubadora (Villar-Luna, 2009). Cada tercer día se realizó la colecta de juveniles eclosionados en vasos de precipitados (Fig.2E) y conservados a temperatura de 4°C hasta obtener el inóculo necesario. La desinfección y ensayos fueron conducidos bajo esterilidad en una campana de flujo laminar (Fig.2F).

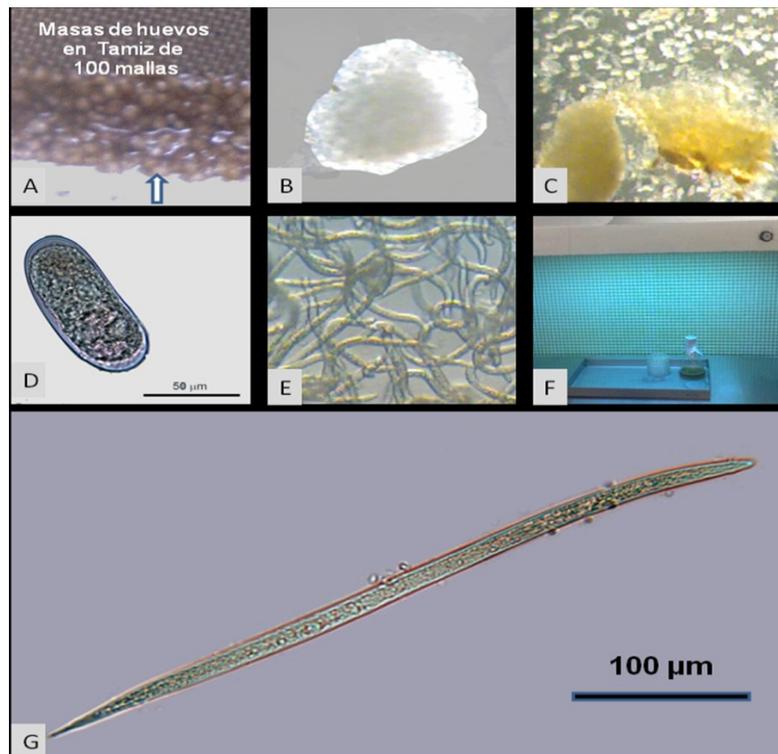


Figura 2: A) Masa de huevecillos en tamiz, B) Masas homogéneas seleccionadas C) Huevos liberados del matriz gelatinoso D) huevo aislado E) Juveniles eclosionados F) Desinfección en una campana de flujo laminar y G) Larva de segundo estadio J₂.

7.3.4 Preparación de la solución de Quitosano

De acuerdo a determinaciones previas, los tres grados de acetilación de este producto fueron: Q1= kDA=100 con una solubilidad del 94.5%, Q2= Quitina kDA=55 con una solubilidad del 47.3% y Q3=Quitina kDA=27 con una solubilidad del 25.5%. Para preparar las soluciones stock de quitina-quitosano (1%, w/v) se pesó la hojuela de los materiales en una balanza granataria marca OHAUS® modelo Scout-pro, 2grs de Q1(2000 ppm), 1gr de Q₂ y 0.54grs de Q₃, se disolvieron en 0.5% (v/v) de ácido acético, es decir se tomaron 5.0 ml de ácido acético glacial al 99.9% disuelto en 95 ml de agua destilada estéril, y se aforo cada solución a 1L, 0.5L y 0.250L respectivamente, lo anterior para obtener las soluciones stock a 2000 ppm (Du *et al.* 1997) y se mantuvo bajo agitación magnética por 24hrs, la solución resultante se filtro a vacío sobre papel Whatman del número 4, el p.H., se ajustó a 5.6 agregando NaOH al 1N, con un potenciómetro marca HANNA®. Las soluciones stock se esterilizaron a 121°C durante 20 minutos y las concentraciones (250, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm) se obtuvieron por dilución con agua destilada (Romanazzi *et al.*, 2002). Se agregó 1.5ml de las concentraciones en pozos de placas Corning® con una micropipeta marca EPENDORF®.

7.3.5 Bioensayo *in vitro* 1. Efecto de quitina-quitosano para inhibir la eclosión de masas de huevos

Obtenidas las masas de huevos se realizó un primer experimento, se evaluó cinco concentraciones (2000, 1500, 1000, 500 y 250 ppm) así como un (Q0) Testigo ácido acético y (T) Testigo absoluto. Se realizaron observaciones durante 11 días (Peña-Rodríguez, 2003) para darle seguimiento a la variable eclosión. Lo anterior fue conducido en placas de cultivo de tejidos estéril de 24 pozos (Corning, New York®). Se agregó 1.5ml en cada uno de los pozos con

una micropipeta para evitar derrames, adicionando 2 masas de huevos por pozo utilizado en los tratamientos con 9 repeticiones. Obteniendo así 135 pozos utilizados con un total de 270 masas de huevos evaluados.

7.3.6 Bioensayo *in vitro* 2. Efecto de quitina-quitosano para inhibir la eclosión de huevos aislados

Obtenidos los huevos aislados por medio de la técnica descrita anteriormente se desarrollo un segundo experimento donde se evaluaron los cinco tratamientos Q1, Q2 y Q3 con cinco dosis (2000, 1500, 1000, 500, y 250 ppm) mas los testigos (Q0) y (T), Las observaciones y conteo de huevos eclosionados se realizo durante 11 días (Peña-Rodríguez, 2003). Para lo cual se utilizaron placas estériles de 24 pozos (Corning, New York®), en cada pozo se agregó 1.5 ml con una micropipeta para evitar derrames, se adicionaron 200 huevos aproximadamente previo conteo en 100 µL. Se conto con 9 repeticiones por tratamiento, utilizando 15 placas de cultivos de tejidos como unidad experimental obteniendo así 135 pozos utilizados con un total de 27,000 huevos evaluados.

7.3.7 Bioensayo *in vitro* 3. Efecto de quitina-quitosano para evaluar la propiedad nematocida o nematostático sobre larvas J₂

Obtenidas las larvas J₂, se desarrollo un tercer experimento donde se evaluó los diferentes tratamiento a base de quitina en tres gados desacetilado; Q1, Q2 y Q3 a 2000, 1500, 1000, 500, y 250 ppm, así como un (Q0) Testigo acido acético y (T) Testigo absoluto. Se realizaron observaciones posteriores a las 24 hrs de realizada su inmersión para evaluar su inmovilidad; la recuperación de las larvas en agua destilada se evaluó posterior a las 72 hrs del tratamiento. El experimento se realizo en placas de cultivo de 24 pozos (Corning, New York®). En cada pozo

se agrego 1.5 ml de la solución de quitosano mas 200 ± 20 nematodos. Se conto con nueve repeticiones por tratamiento. Al termino de la preparación de los diferentes tratamientos, sobre masas de huevos, huevos aislados y sobre J_2 se procedió a introducirlos en una incubadora marca FELISA®, regulada con una temperatura de $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, por un periodo de tiempo de 24 hrs; transcurrido el tiempo de exposición, se realizo un lavado con agua destilada para permitir una posible recuperación del efecto de las formulaciones (Q1, Q2 y Q3). El lavado de las masas de huevos y huevos aislados se realizo a las 264 hrs y en el caso de los J_2 a las 72 hrs después de la aplicación de los tratamientos

7.3.8 Bioensayo *in vivo* 4. Efecto de Quitosano en la interacción nematodo-planta para inhibir la invasión de J_2

Obtenidas las larvas J_2 en la forma descrita con anterioridad se desarrollo un cuarto experimento, se evaluaron cuatro tratamientos a base de quitosano, se seleccionó la dosis con la que se obtuvo un mejor resultado en los bioensayos *in vitro*. La Q1= Quitosano KDA=100 con una solubilidad del 94.5%, se evaluó a 2000 ppm, a los 0, 3, y 5 días así como un (Q0) Testigo acido acético y (T) Testigo absoluto. La prueba se llevo a cabo en una cámara bioclimática a temperatura $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 de oscuridad y una intensidad luminosa de 6768 lux (luz fluorescente) (Fig.3E). La unidad experimental consistió en una caja de petri de 60 mm de diámetro que contenía peat-most (Fig.3C) como sustrato, en cuyo interior se coloco una planta que presentaba entre cuatro y cinco hojas verdaderas de chile *Capsicum annuum* cv. Taranto, estas fueron inoculadas con 2000 J_2 de *M. incognita* en la base del tallo (Fig. 3D), a los 0, 3 y 5 días posteriores a su tratamiento con Quitosano a 2000 ppm. Se mantuvieron en observación constante durante 21 días, periodo de tiempo después del cual se realizo tinción con fucsina acida para realizar conteo de la invasión de juveniles (Prasad and Webster, 1967).

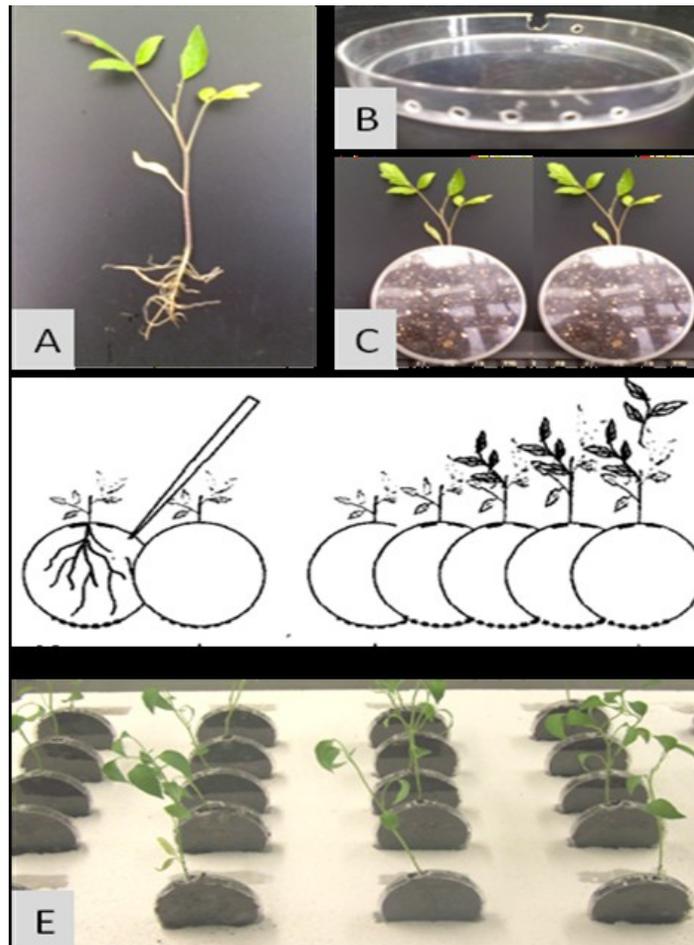


Figura 3: A) Plántula CM-334 susceptible al nematodo agallador, B) Caja petri perforada para inoculación, C) Unidad experimental, D) Forma de inoculación de J_2 en la unidad experimental, E) Bioensayo en plántula

7.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de las fuentes de variación, tratamientos, concentraciones y las interacciones respectivas de los bioensayos *in vitro*, fueron determinados mediante análisis ANOVA con un intervalo de confianza del 95%; las diferencias estadísticas entre las medias fueron comparadas utilizando la prueba de rangos múltiples Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (RGWQ), este ultimo más potente que la prueba de Tukey ($P \geq 0.05$), y los bioensayos *in vivo*

fueron sometidos a un análisis de varianza en un modelo estadístico bloqueo al azar generalizado (ver sección de Anexos). El programa estadístico empleado fue SAS Intitute. 2002. User' guide. The SAS System software for Windows realse 9.0. SAS Institute, Cary N.C. USA.

7.5 Resultados

7.5.1 Identificación del nematodo colectado

De las muestras colectadas en la zona de estudio se corroboró la identificándose a género y especie usando como criterios, las características del patrón perineal de *M. incognita* (Fig.4A) observaciones previas de las agallas típicas inducidas por este género en la raíz de chile.

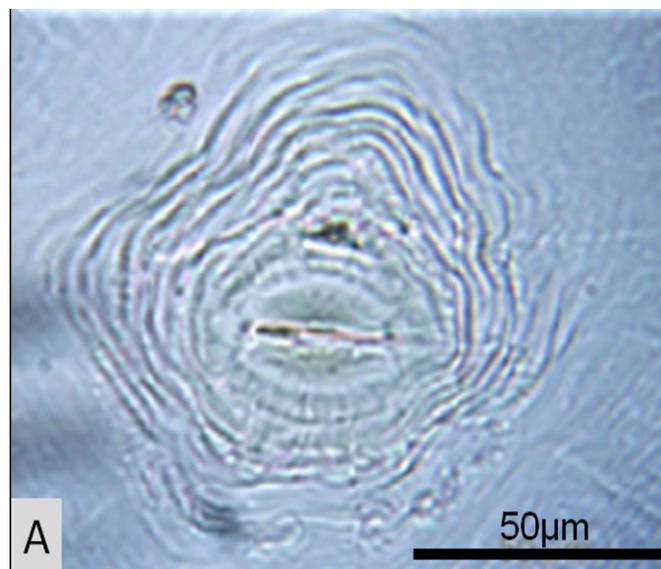


Figura 4: A. Cortes realizados de hembras del genero *Meloidogyne incognita* colectados.

7.5.2 Efecto de la Quitina-Quitosano en la eclosión de huevecillos

7.5.3 Masas de huevecillos.

La información obtenida sobre la eclosión de masas de huevos que se muestra en el cuadro 1, se observa que después de las 24 hrs de tratamiento los bioensayos 4 y 9 obtuvieron una media mínima de eclosión de 1.4 y 3.3 respectivamente, este último obtenido en la segunda fecha de

evaluación, seguidas de letras estadísticamente iguales. Posterior a su recuperación de 264 hrs en agua destilada, los mejores tratamientos con una media menor de eclosión fue (Q1) 2000 ppm, de 13.3 y 14.7, respectivamente, comparados con nuestro testigo absoluto (ensayo 21) y testigo ácido acético (ensayos 16-20) se obtuvo una media máxima de eclosión de 164.9 y 207.3 respectivamente. Observándose un efecto reducido en la inhibición de eclosión para las masas de huevos tratados de *M. incognita*.

Cuadro 1. Bioensayo 1. Comparación de medias en eclosión en masas de huevecillos de la interacción de tratamientos evaluados de *M. incognita*

Ensayo	Tratamiento	Dosis ppm	1 ^{er} Bioensayo		2 ^o Bioensayo	
			Media 24 hr	Media 264 hr	Media 24 hr	Media 264 hr
1	Q1	250	3.8 a	127 defgh	6.3 ab	109.1 cd
2		500	5.6 a	166.4 fgh	8.5 ab	171.3 ef
3		1000	3.1 a	79.4 cde	6.1 ab	92.3 c
4		1500	1.4 a	68.1 abc	3.2 a	69.5 bc
5		2000	2.1 a	13.3 a	4.8 ab	14.6 a
6	Q2	250	5.1 a	141.7 efgh	8.7 ab	117.3 cde
7		500	11.3 abc	91.0 cdef	17.0 abc	64.0 bc
8		1000	4.8 a	105.2 cdefg	7.7 ab	104.5 cd
9		1500	4.2 a	93.2 cdef	3.3 a	103.0 cd
10		2000	4.2 a	79.4 cde	6.5 ab	69.0 bc
11	Q3	250	10.3 ab	123.3 cdefg	11.6 abc	107.5 cd
12		500	10.3 ab	97.7 cdef	15.1 abc	123.7 cde
13		1000	13.3 abc	71.5 abc	27.3 bc	70.0 bc
14		1500	24.5 bcd	66.4 abc	18.6 abc	78.4 c
15		2000	17.4 abcd	58.8 ab	17.5 abc	74.5 c
16	Q0	250	32 def	172.8 gh	26.2 abc	120.8 cde
17		500	28.4 cdef	148.6 efgh	21.6 abc	165.4 def
18		1000	26 bcde	164.8 fgh	25.2 abc	105.6 cd
19		1500	34.8 ef	101.5 cdef	25.2 abc	115 cde
20		2000	42.8 f	96.0 cdef	34.2 c	122.1 cde
21	Testigo	Agua	39.7 ef	207.3 h	53.2 d	200.3 f

Medias seguidas por letra igual, son estadísticamente iguales entre sí (RGWQ, $\alpha = 0.05$)

7.5.4 Huevecillos aislados.

La eclosión de huevos aislados de *M. incognita*, posterior a las 24 hrs del tratamiento, los mejores tratamientos fueron: Q1, Q2 y Q3 en todas sus concentraciones ya que estadísticamente son iguales ($\alpha= 0.05$), obteniendo una media mínima de eclosión de 0.0 a una máxima de 6.8, comparado con los testigos ácido (Q0) y el testigo agua destilada (T) obteniendo 17.1 y 22.4, respectivamente, mientras que posterior a las 264 hrs de su probable recuperación con agua destilada, los tratamientos (Q1) 2000 ppm, y (Q1) 1000 ppm, obtuvieron una media mínima de 0.9 y 1.6 respectivamente.

Cuadro 2. Bioensayo 2. Comparación de medias en la eclosión de huevos aislados interacción de tratamientos evaluados de *M. incognita*

Ensayo	Tratamiento	Dosis ppm	1 ^{er} Bioensayo		2 ^o Bioensayo	
			Media 24 hr	Media 264 hr	Media 24 hr	Media 264 hr
1	Q1	250	0.0 a	10.4 abcde	0.0 a	10.4 bcd
2		500	0.4 a	9.5 abcde	0.4 a	12.2 bcde
3		1000	0.3 a	2.8 ab	0.0 a	1.5 a
4		1500	0.1 a	2.7 ab	0.1 a	2 a
5		2000	0.0 a	0.8 a	0.0 a	1.7 a
6	Q2	250	3.3 abc	13.0 abcde	3.3 a	12.2 bcde
7		500	6.0 abcd	17.7 defg	1.6 a	17.3 def
8		1000	0.2 a	6.7 abcd	2.1 a	6.8 ab
9		1500	0.0 a	5.6 abcd	0.0 a	6.7 ab
10		2000	0.4 a	13.8 abcde	0.0 a	11.3 bcd
11	Q3	250	1.2 ab	14.6 bcde	2.4 a	19.6 efg
12		500	3.6 abcd	11.3 abcde	6.7 ab	16 cdef
13		1000	0.2 a	7.5 abcd	0.4 a	8.1 abc
14		1500	0.0 a	5.3 abc	0.0 a	10 bcd
15		2000	0.1 a	24.8 fgh	0.0 a	21.6 fg
16	Q0	250	7.7 bcd	31.2 h	14.4 c	26.8 g
17		500	8.6 cde	31.8 h	14.1 c	27.4 g
18		1000	9.1 de	14.4 abcde	12.2 bc	19.8 efg
19		1500	8.8 de	19.2 defg	14.1 c	16.6 def
20		2000	11.2 e	27.3 gh	13.7 c	11 bcd
21	Testigo	Agua	22.4 f	21 efg	18.1 c	14 bcdef

Medias seguidas por letra igual, son estadísticamente iguales entre sí (RGWQ, $\alpha = 0.05$)

7.5.5 Efecto de Quitina-Quitosano en la inmovilización de estadios juveniles J₂.

La inmovilización de J₂ posterior a las 24 hrs del tratamiento, se observó que en las formulaciones de (Q2) 250 ppm, y (Q1) 2000 ppm, presentaron una media de inmovilidad mayor entre 17.4 y 15.0 respectivamente, mientras que posterior a 72 hrs después de su probable recuperación en agua destilada, los tratamientos con una mayor inmovilización fueron (Q1) 2000 ppm, tanto en la primera como segunda fecha de evaluación, obteniendo una media mayor de inmovilización de 186.7y 179.3 respectivamente, comparado con el testigo en ácido (Q0) de 70.2 y el testigo en agua destilada (T) de un máximo de 65.4, lo que se deduce en una reducción de la actividad de juveniles de *M. incognita*.

Cuadro 3. Bioensayo 3. Comparación de medias en la inmovilidad de J₂ interacción de tratamientos evaluados de *M. incognita*

Ensayo	Tratamiento	Dosis ppm	1 ^{er} Bioensayo		2 ^o Bioensayo	
			Media 24 hr	Media 72 hr	Media 24 hr	Media 72 hr
1	Q1	250	1.1 ef	137 b	1.22 ef	143.7 b
2		500	2.2 ef	133.2 bc	1.66 ef	142.3 bc
3		1000	3.1 ef	130.6 bc	0.66 f	126.0 cd
4		1500	11.8 ab	129.3 bc	10.00 bc	137.4 bcd
5		2000	15 a	179.3 a	10.88 b	186.6 a
6	Q2	250	11.5 ab	137.2 b	17.44 a	137.6 bc
7		500	10.2 bc	110.2 cd	7.88 bcd	117.5 cd
8		1000	12 ab	86 de	11.88 ab	85.3 ef
9		1500	2.7 ef	92.7 de	12.11ab	87.7 ef
10		2000	1.4 ef	110.5 cd	4.88 cdef	106.6 de
11	Q3	250	3.2 ef	79.7 ef	1.77 ef	80.1 fg
12		500	7.3 cd	69.3 efg	7.11 bcd	77.2 fg
13		1000	4.3 de	68.3 efg	3.22 def	66.5 fgh
14		1500	0.7 ef	52.2 g	1.22 ef	58.6 ghi
15		2000	0.1 f	53.4 fg	0.66 f	24.1 j
16	Q0	250	0.4 f	54.8 fg	0.11 f	44.1 hij
17		500	0.2 f	68.6 efg	0.55 f	58.8 ghi
18		1000	0.5 ef	70.2 efg	0.88 ef	47 hij
19		1500	0.2 f	65.8 efg	0.77 f	37 ij
20		2000	0.5 ef	46.5 g	0.55 f	55 ghi
21	Testigo	Agua	0.1 f	20.2 h	1.11 ef	65.4 fgh

Medias seguidas por letra igual, son estadísticamente iguales entre sí (RGWQ, $\alpha = 0.05$)

7.5.6 Efecto de quitosano (Q1) 2000 ppm, en la inhibición de invasión de estadios juveniles J₂ en plántula.

En el cuadro 4: se observa que el tratamiento de Quitosano (Q1), a los 21 días después de aplicados los compuestos del biopolimero, se observo una invasión de 24.7%. Los tratamientos restantes, inoculados de J₂ a los tres y cinco días se obtuvo 23.1% y 35.4% respectivamente. Con respecto a los testigos acido (Q0) y testigo agua (T) obtuvieron un 69.9% y 100% respectivamente.

Cuadro 4. Bioensayo 4. Comparación del % de invasión de J₂ de *M. incognita* en plántula de los tratamientos evaluados en concentración de 2000 ppm.

Tratamiento	% de Invasión	Medias	Agrupamiento REGWQ
0d	24.7	9.8	a
3d	58.3	23.1	b
5d	89.3	35.4	cd
Q0	69.9	27.7	bc
T	100	39.6	d

Medias seguidas por letra igual, son estadísticamente iguales entre sí (RGWQ, $\alpha = 0.05$)

7.6 Conclusion.

El mayor porcentaje a la inhibición de eclosión en masas de huevos tratados con quitina quitosano se obtuvo posterior a las 264 hrs de la evaluación *in vitro* del tratamiento de Quitosano 1500, inhibiendo la eclosión hasta en un 96.8 %, en tanto que para el bioensayo en huevos aislado de la masa Quitosano (Q1) 2000 ppm, obtuvo el 100 % en la inhibición de eclosión, por otro lado la inmovilización *in vitro* de los juveniles J₂ de *M. incognita*, el mejor tratamiento fue con Quitosano 2000 ppm, debido a inmovilizar a las 72 hrs después de realizado el lavado con agua destilada de un 89.7 % a 93.3 %.

En relación a los tratamientos *in vivo*, el menor índice de invasión se observó a los 0 días (0d) de tratamiento (inoculación 2000 J₂ + Quitosano (Q1) 2000 ppm + planta chile) debido a que redujo en un 90.2 % la invasión de este estadio en los puntos de crecimiento de la raíz.

7.7 DISCUSIÓN GENERAL

De acuerdo con los resultados obtenidos en los distintos tratamientos *in vitro*, sobre la eclosión de masas de huevos de *M. incognita* posterior a las 24 hrs de exposición a los tratamientos de quitina-quitosano, obtuvimos que en el primer bioensayo todas las concentraciones de (Q1) fueron estadísticamente iguales, siendo (Q1) 1500 ppm el mejor resultado con una media mínima de eclosión de 1.4, en el segundo bioensayo se observó la misma tendencia donde el mejor resultado se obtuvo de (Q1) 1500 ppm, con una media de eclosión de 3.2, ambos resultados comparados con los testigos absolutos, ácido acético y agua destilada en los cuales se obtuvo una media máxima en la eclosión de 42.9 y 53.2 respectivamente. Posterior a 264 hrs de su recuperación con agua destilada, observamos en el primer bioensayo que (Q1) 2000 ppm, obtuvo el mejor resultado en el primer bioensayo con una media de eclosión de 13.3 y 14.7 en el segundo bioensayo respectivamente, comparados con los testigos agua y ácido acético con una media máxima de 207.3 y 172.9 respectivamente.

Al analizar el efecto de los tratamientos *in vitro* sobre la eclosión de huevos aislados de la matriz gelatinosa, se obtuvo un resultado satisfactorio en todos los tratamientos Q1, Q2 y Q3 de ambos bioensayos realizados, ya que se comportaron estadísticamente igual obteniendo una media mínima a la eclosión de 0.0 y una máxima de 2.4, comparados con el testigo agua y ácido acético, con medias máximas a la eclosión de 22.4 y 14.1 respectivamente, posterior a 264 hrs de su recuperación en agua destilada, se obtuvo que el mejor tratamiento en ambos bioensayos

realizados Q1 2000 ppm, resulto con la menor media de eclosion de 0.9 y 1.8 este último del segundo bioensayo siendo resultados estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos, comparados con los testigo agua y ácido acético, que obtuvieron una media máxima de eclosion de 21.0 y 27.3 respectivamente, lo anterior coincide en pruebas *in vitro* realizadas por (Peña-Rodríguez, 2003), cabe aclarar que de acuerdo a los resultados obtenidos, la efectividad del quitosano depende a su concentración, grado de polimerización, nivel de desacetilación y tiempo de exposición (Bautista-Baños *et al.*, 2004; Chea *et al.*, 1997; Du *et al.*, 1998).

En relación con los resultados *in vitro*, sobre los estadios infectivos J₂, posterior a 24 hr de tratamiento, el mejor resultado a la media de máxima de inmovilidad fue en el tratamiento (Q1) 2000 y (Q1) 250 ppm, para el primer y segundo bioensayo, resultando una media de 15.0 y 17.4 respectivamente estadísticamente diferente a todos los tratamientos evaluados, estos últimos comparados con los testigos agua y ácido acético con una media máxima de inmovilidad de 1.1 y 0.9 respectivamente, lo anterior confirma lo obtenido por (Peña-Rodríguez, 2003) el cual obtuvo el 100% de inmovilidad tanto a las 24 hrs como 264 hrs de su lavado con agua destilada, es importante mencionar que posterior a la aplicación del tratamiento de (Q1) 2000 ppm, las larvas J₂ fueron reduciendo significativamente su movilidad después de 5 horas de aplicado el tratamiento, confirmado sus propiedades nematostáticas después de este lapso de tiempo (Bautista-Baños *et al.*, 2003).

Por otra parte el tratamiento *in vivo*, sobre la invasión de estadios juveniles J₂ *M. icognita*, en la interacción nematodo-planta, se obtuvo el menor porcentaje de invasión en el tratamiento realizado a los cero días (0d), resulto una media de invasión de 9.8; es decir solo el 24.7% de larvas inoculadas lograron invadir las raíces los tratamientos restantes, inoculados de J₂ a los tres y cinco días se obtuvo 23.1% y 35.4% respectivamente. Con respecto a nuestros testigos agua y

ácido acético, se obtuvo una media de invasión de 39.6 y 27.7 respectivamente, se considero al testigo-agua como el 100% de la invasión. Cabe mencionar que 3 días después de establecido el experimento se observo una ligera fitotoxicidad excepto nuestro testigo agua destilada, debido a la solubilidad de la solución stock en ácido acético, sin embargo las plantas se recuperaron posteriormente sin presentar un daño significativo, sugiriéndose realizar en futuros trabajos la histopatología para observar la activación de mecanismos de defensa en células huésped, los cuales se relacionan con la inducción de fitoalexinas y compuestos fenólicos, y el incremento en la producción de enzimas quitinasas, quitosanasas, glucanasas o fenilalanina amonía-liasas (Vander y col., 1998).

El mejor resultado obtenido *in vitro* en masas de huevos para *N. aberrans* posterior a 264 hrs de tratamiento fue (Q1) 2000 y 1500 ppm obteniendo una media mínima en eclosión de 16.5 y 17.8 respectivamente, en huevos aislados fue (Q1) 1500, (Q1) 250 ppm, con una media mínima de eclosión de 0.8 y 1.1 respectivamente, con respecto al bioensayo de juveniles J₂ después de 72hrs después de realizado el lavado con agua destilada, los mejores tratamientos fueron (Q1) 2000 y (Q2) 1500 ppm, con una media mínima de inmovilidad de 145.9 y 140.5 respectivamente, comparados con los testigos (Q0) y (T) que obtuvieron una media de 27.1 y 51.9 respectivamente, este fenómeno pudiera ser ocasionado por la baja concentración en el bioensayo *in vitro*, ya que a mayor concentración de quitina-quitosano, mayor será el efecto producido según los resultados arrojados por el trabajo realizado. En relación al bioensayo *in vivo*, el menor índice de invasión se observo a los 0 días (0d) de tratamiento resultando un 6% de invasión con respecto a los testigos (Q0) y (T), que obtuvieron una invasión de 49% y 100% respectivamente en los puntos de crecimiento de la raíz.

Los resultados muestran que realmente hubo un efecto nematicida *in vitro* del quitosano a diferentes concentraciones, así como la inhibición de eclosión de huevos en masa y aislados de la matriz gelatinosa, favoreciendo de esta forma que las poblaciones de los J₂ se vean reducidas, a causa de las formulaciones empleadas en este experimento. La actividad proteolítica y collagenolítica pudiese explicar la inactividad de las larvas y el efecto en la inhibición de la incubación de las masas de huevos de nematodos fitoparasíticos (Galper et al., 1990).

Resultados aquí señalados han sido reportados por Peña-Rodríguez, (2003), quien al evaluar *in vitro* la actividad nematicida del biopolímero natural quitosano y extractos de las hojas de *Larrea tridentata* (brinker, 1993) sobre *N. aberrans*, también encontró una baja eclosión sobre huevecillos y una inmovilización significativa del nematodo de esta especie. Aunque cabe señalar que los tratamientos con *L. tridentata*, mostraron efectos nematostáticos solamente.

7.8 CONCLUSION GENERAL

En relación a los tratamientos evaluados *in vitro* del nematodo *N. aberrans* se obtuvo que la inmovilización de J₂, se logra a las 72 horas con Quitosano (Q1) 2000 y (Q2) 1500 ppm. Por otro lado la menor media de eclosión en masas de huevos se logra a las 264 horas con el tratamiento de Quitosano (Q1) 2000 y 1500 ppm, en tanto que para huevecillos aislados de la matriz gelatinosa se logra a 264 horas, con los tratamientos de (Q1) 1500 y (Q1) 250 ppm, respectivamente. Referente a la invasión de J₂ inoculados en palntula de chile, se logro en el tratamiento (0d) evaluado (Q1) 2000 ppm.

Con respecto a los tratamientos *in vitro* evaluados para *M. incognita*, se obtuvo que la inmovilización de J₂, se logra a las 72 horas con Quitosano (Q1) 2000 ppm, referente a la

menor media de eclosion en masas de huevos se logra en el tratamiento de Quitosano (Q1) 2000 ppm, en tanto que para huevos aislados de la matriz gelatinosa la menor media de eclosión se logra en los tratamientos de (Q1) 2000 y (Q1) 1000 ppm, respectivamente. Referente a la invasión de J₂ inoculados en plántula de chile cv. Taranto, se logro en el tratamiento (0d), mientras que los tratamientos restantes, inoculación de J₂ a los tres y cinco días no mostraron diferencias estadísticas (PrF= 0.0001).

7.9 LITERATURA CITADA

Amborabe Benigne-Ernest, Janine Bonmort, Pierrette Fleurat-Lessard and Gabriel Roblin. 2008. Early events induced by chitosan on plant cells. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59, No. 9, pp. 2317–2324

Bautista-Baños, S., López-Hernández, M., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C.L. 2003. Effect of chitosan and plant extraéis on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levéis and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22:1087-1092.

Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., and Bosquez-Molina, E. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chilosan and plant extraéis. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:178-186.

Benhamou N. 1992. Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. *Phytopathology* 82, 1185–1093.

Benhamou, N. 1996. Elicitor-induced plant defense pathways. *Trends in Plant Science*, 1(7):35-240.

Cheah, L., Page, B., and Shepherd, R. 1997. Chitosan coating for inhibition of *sclerotinia* rot of carrots. *New Zeland Journal of Crop and Horticultiural Science* 25:89-92.

Du, J., Gemma, H., and lwqhor, S. 1997. Effects of chitosan coating on the storage of peach, japanese pear, and kiwifruit. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science* 66:15-22.

Du, J., Hiroshi, G, and Shuichi, I. 1998. Effects of chitosan coating on the sorability and on the ultrastructural changes of “Jonagold” apple fruit in storage. *Food Preservation Science* 24:23-27.

El Ghaouth A, Arul J, Benhamou N, Asselin A, Be´langer RR. 1994. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defence reactions. *Phytopathology* 84, 313–320.

Hadwiger LA, Beckman JM. 1980. Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiology* 66, 205–211.

Khöle H, Jeblick W, Poten F, Blaschek W, Kauss H. 1985. Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca²⁺- dependent process. *Plant Physiology* 77, 544–551.

Muzarelli, R. A. 1977. Chitin Primera Edición. Ed Pergamon Press Gran Bretaña. pp 309

Nitao, J. K.; S.L.F. Meyer and D.J. Chitwood. 1999. In vitro assays of *Meloidogyne incognita* and Heterodera glicines for detección of nematode antagonist fungal compounds. *Journal of Nematology* 31(2):83-172

Peña, F. R., 2003. Actividad nematicida *in vitro* de formulaciones quitosan-*L. tridentata* (D.C.) Coville contra el nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y allen, 1944. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro UAAAN. Coahuila México. 33-40p.

Prasad, S. K. and Webster, J. M. 1967. Effect of temperature on the rate of development of *Nacobbus serendipiticus* in excised tomato roots *Nematologica* 13:85-90.

Romanazzi, G, Nigro, F., Ippolito, A., Di Venere, D., and Salerno, M. 2002. Effects of pre-and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science* 67:1S62-1867.

SAS Intitute. 2002. User' guide. The SAS System software for Windows realse 9.0. SAS Institute, Cary N.C. USA.

Taylor A.L., and J.N. Sasser. 1975. Biology, Identification and Control of root-knot nematodes. North Carolina State University Graphics. U.S.A.111p

Vander, P., Varum, K.M., Domard, A., El Gueddari, N.E. y Moerschbacher, B.M. 1998. Comparison of the ability of partially N-acetilated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.*, 118: 1353-1359.

Villar-Luna E., 2009. Respuesta hipersensititva en el follaje de chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39 (1): 143-155.

Walker-Simmons M, Jin D, West CA, Hadwiger L, Ryan CA. 1984. Comparison of proteinase inhibitor-inducing activities and phytoalexin elicitor activities of a pure fungal endopolygalacturonase, pectic fragments, and chitosans. *Plant Physiology* 76, 833–836.

8. ANEXOS

Análisis de Varianza realizados en bioensayos de *N. aberrans*

Cuadro 1. Análisis de varianza de la eclosión de masas de huevos en el 1^{er} bioensayo

F.V.	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr > F
trat	3	53522.9	17840.9	8.1	4.94E-05 Ns
dos	4	97984.8	24496.2	11.1	5.75E-08 Ns
trat*dos	12	84555.4	7046.3	3.8	0.0004216**
trat vs fact	1	100854.1	100854.1	45.4	2.45E-10 Ns
Error	168	372989.8	2220.2		
Total correcto	188	709906.2			

$$R^2 = 0.474593$$

$$C.V. = 65.72284$$

$$\text{Eclosión } \bar{\chi} = 71.69$$

Cuadro 2. Análisis de varianza de la eclosión de masas de huevos en el 2^o bioensayo

F.V.	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	3	36118.9	12039.6	7.7	7.99E-05 Ns
Dos	4	107664.5	26916.1	17.1	8.77E-12 Ns
trat*dos	12	126480.7	10540.1	6.7	9.39E-10 Ns
trat vs fact	1	299629.4	299629.4	190.4	1.96E-29 Ns
Error	168	264391.3	1573.8		
Total correcto	188	596284.9			

$$R^2 = 0.556602$$

$$C.V. = 52.03155$$

$$\text{Eclosión } \bar{\chi} = 76.24$$

Cuadro 3. Análisis de varianza de la eclosión de huevos aislados en el 1^{er} bioensayo

F.V.	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	3	5988.8	1996.3	29.3	2.66E-15 Ns
Dos	4	4111.7	1027.9	15.1	1.45E-10 Ns
trat*dos	12	2096.8	174.8	2.6	0.00389316 **
trat vs fact	1	2522.7	2522.7	37.1	7.54E-09 Ns
Error	168	11433.6	68.1		
Total correcto	188	26153.7			

$$R^2 = 0.562832$$

$$C.V. = 61.89701$$

$$\text{Eclosión } \bar{\chi} = 13.32$$

Cuadro 4. Análisis de varianza de la eclosión de huevos aislados en el 2° bioensayo

F.V.	g.l.	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	3	3657.4	1219.2	23.6	8.96E-13 Ns
dos	4	1281.4	320.4	6.2	0.00011563**
trat*dos	12	1567.8	130.7	2.6	0.00448955**
trat vs fact	1	1824.3	1824.3	35.2	1.63E-08 Ns
Error	168	8696.7	51.8		
Total correcto	188	17027.7			

$R^2 = 0.489262$ C.V.= 53.98280 Eclosión $\chi = 13.32$

Cuadro 5. Análisis de varianza de la inmovilidad de juveniles infectivos J₂ 1^{er} bioensayo

F.V.	g.l.	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	3	54789.3	18263.1	118	3.76E-41 Ns
Dos	4	1009.1	252.3	1.6	0.168964 Ns
trat*dos	12	1915.5	159.6	1	0.423703 Ns
trat vs fact	1	8933.3	8933.3	57.8	2.01E-12 Ns
Error	168	26000	154.7		
Total correcto	188	92647.2			

$R^2 = 0.719365$ C.V.= 8.053237 Inmovilidad $\chi = 154.47$

Cuadro 6. Análisis de varianza de la inmovilidad de juveniles infectivos J₂ 2° bioensayo

F.V.	g.l.	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	3	70734.2	23578.1	105.9	2.28E-38 Ns
Dos	4	8196.3	2049.1	9.2	1.05E-06 Ns
trat*dos	12	44545	3712.1	16.6	6.78E-23 Ns
trat vs fact	1	307	306.9	1.4	0.243653 Ns
Error	168	37659	224.2		
Total correcto	188	161441.2			

$R^2 = 0.766733$ C.V.= 10.38690 Inmovilidad $\chi = 144.14$

Cuadro 7. Análisis de varianza de la invasión de juveniles infectivos J₂ en plántula

F.V.	g.l.	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	3812.3	423.7	11.8	.0001**
Error	40	1427.2	35.7		
Total	49	5240.1			

$R^2 = 0.757635$ C.V.= 45.45870 Invasión $\chi = 13.14$

Análisis de Varianza realizados en bioensayos de *M. incognita*

Cuadro 1. Análisis de varianza de la eclosión de masas de huevos en 1^{er} bioensayo

F.V.	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	3	74982.6	24994.2	16.5	1.97E-09 Ns
Dos	4	147971.3	36992.9	24.3	6.07E-16 Ns
trat*dos	12	67538.1	5628.2	3.7	1.4E-10 Ns
trat vs fact	1	92678.9	92678.9	61.2	5.5E-13 Ns
Error	168	254487.1	1514.9		
Total correcto	188	637657.9			

$$R^2 = 0.600903$$

$$C.V. = 35.93713$$

$$\text{Eclosión Media} = 71.69$$

Cuadro 2. Análisis de varianza de la eclosión de masas de huevos en 2^o bioensayo

F.V.	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	3	40211.7	13403.9	9.1	1.34E-05 Ns
Dos	4	77961.6	19490.5	13.2	2.29E-09 Ns
trat*dos	12	98712.9	8226.1	5.6	5.67E-08 Ns
trat vs fact	1	86391.8	86391.9	58.5	1.52E-12 Ns
Error	168	248203.8	1477.5		
Total correcto	188	551482.1			

$$R^2 = 0.549933$$

$$C.V. = 36.70470$$

$$\text{Eclosión } \bar{\chi} = 104.71$$

Cuadro 3. Análisis de varianza de la eclosión de huevos aislados en el 1^{er} bioensayo

F.V.	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	3	9004.4	3001.5	93.9	1.04E-35 Ns
Dos	4	3639.4	909.9	28.4	4.83E-18 Ns
trat*dos	12	2221.04	185.1	5.8	2.53E-08 Ns
trat vs fact	1	472.2	472.2	14.8	0.00017368**
Error	168	5375.1	32		
Total correcto	188	20712.1			

$$R^2 = 0.740485$$

$$C.V. = 40.60$$

$$\text{Eclosión } \bar{\chi} = 13.93$$

Cuadro 4. Análisis de varianza de la eclosión de huevos aislados en el 2° bioensayo

F.V.	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	3	5285.4	1761.8	67.7	9.54E-29 Ns
Dos	4	2940.9	735.2	28.3	6.04E-18 Ns
trat*dos	12	1774.4	147.9	5.7	3.65E-08 Ns
trat vs fact	1	8.7	8.7	0.3	0.566427 Ns
Error	168	4372.4	26.02		
Total correcto	188	14381.7			

$$R^2 = 0.695971$$

$$C.V. = 39.11$$

$$\text{Eclosión } \bar{\chi} = 13.04$$

Cuadro 5. Análisis de varianza de la inmovilidad de juveniles infectivos J₂ en el 1^{er} bioensayo

F.V.	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	3	198433.7	66144.6	228.02	5.44E-59 Ns
Dos	4	6777.5	1694.4	5.9	0.00020035**
trat*dos	12	32116	2676.4	9.3	1.57E-13 Ns
trat vs fact	1	46382.03	46382.03	159.9	3.52E-26 Ns
Error	168	48732.9	290.07		
Total correcto	188	332442.1			

$$R^2 = 0.853409$$

$$C.V. = 18.86$$

$$\text{Inmovilidad } \bar{\chi} = 90.28$$

Cuadro 6. Análisis de varianza de la inmovilidad de juveniles infectivos J₂ en el 2° bioensayo

F.V.	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	3	275143.9	91714.6	325.4	9.81E-70 Ns
Dos	4	13994.3	3498.6	12.4	7.21E-09 Ns
trat*dos	12	43221.98	3601.8	12.8	2.39E-18 Ns
trat vs fact	1	5595.5	5595.5	19.9	1.52E-05 Ns
Error	168	47347.1	281.9		
Total correcto	188	385302.7			

$$R^2 = 0.877117$$

$$C.V. = 18.69921$$

$$\text{Inmovilidad } \bar{\chi} = 89.77$$

Cuadro 7. Análisis de varianza de la invasión de juveniles infectivos J₂ en plántula

F.V.	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	6052.08	672.5	8.1	.0001**
Error	40	3303.20	82.6		
Total	49	9355.3			

$$R^2 = 0.646916$$

$$C.V. = 33.50794$$

$$\text{Invasión } \bar{\chi} = 27.12$$

Ns: No significativo

* Para nivel de $p \leq 0.05$

** Para nivel de $p \leq 0.01$

*** Para nivel de $p \leq 0.001$

GLOSARIO.

Abreviaturas	Significado
α	Alfa
β	Beta
*	Dato estadísticamente significativo
**	Dato altamente significativo
°C	Grados centígrados
μ L	Microlitros
0d	Tratamiento cero días (inoculación J ₂ + Q1 + Plantula)
3d	Tratamiento 3 días después de trasplante
5d	Tratamiento 5 días después de trasplante
C.V.	Coeficiente de Variación
CM-334	Planta de chile criolla del Estado de Morelos susceptible a nematodos
cv.	Variedad de planta
F.V.	Fuente de variación
g.l.	Grados de libertad
ha	héctarea
hrs	horas
J ₂	Estadio juvenil 2 infectivo
kDA	Peso molecular medio
kg	kilogramo
L	Litros
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
ml	Mililitros
mts	metros
NaClO	Hipoclorito de sodio
Ns	Dato estadístico no significativo
ppm	Partes por millón
Q0	Testigo ácido acético
Q1	Quitano kDA= 100 con una solubilidad de 94.5
Q2	Quitina kDA= 55 con solubilidad de 47.5
Q3	Quitina kDA=27 con solubilidad de 25.5
R ²	Chi-cuadrada
RGWQ	Prueba de análisis estadístico de Rango múltiple Ryan-Einot-Gabriel-Welsch
T	Testigo agua destilada
v/v	volúmen/volúmen
w/v	Peso/volúmen