



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

DESINFESTACIÓN DE SUELO PARA EL CONTROL DE *Nacobbus aberrans* (Nematoda: Pratylenchidae) MEDIANTE EL USO DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y REGULADORES BIOLÓGICOS.

IVONNE HERRRERA YAÑEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

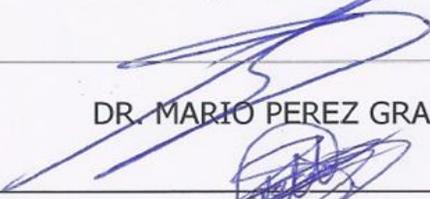
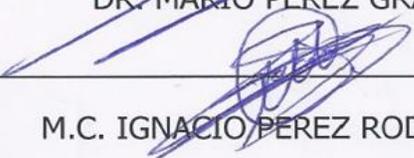
La presente tesis titulada: **DESINFESTACIÓN DE SUELO, PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Nacobbus aberrans* (Nematoda: Pratylenchidae) MEDIANTE EL USO DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y REGULADORES BIOLÓGICOS.** Realizada por la alumna: **IVONNE HERRERA YAÑEZ** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIA

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJO PARTICULAR	
CONSEJERO	 FIRMA _____
	NOMBRE DR. IGNACIO CID DEL PRADO VERA.
ASESOR	 _____
	DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS.
ASESOR	 _____
	DR. MARIO PEREZ GRAJALES.
ASESOR	 _____
	M.C. IGNACIO PEREZ RODRIGUEZ.

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre de 2016

**DESINFESTACIÓN DE SUELO PARA EL CONTROL DE *Nacobbus aberrans*
(Nematoda: Pratylenchidae) MEDIANTE EL USO DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y
REGULADORES BIOLÓGICOS.**

Ivonne Herrera Yañez.
Colegio de Postgraduados, 2016.

RESUMEN

Con el fin de encontrar alternativas de tipo biológico para el control de *N.aberrans* en el cultivo de jitomate en el Estado de México, se realizó un muestreo en parcelas naturalmente infestadas con el nematodo en la localidad de Coatlinchan, Texcoco. De una muestra colectada se obtuvo un aislamiento del hongo parasito de huevos, identificado como *P.chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Gooddard), Zare y Gams.

Del aislamiento obtenido se le realizo las siguientes pruebas: 1) Determinación de la fase de crecimiento y formación de esporas, 2) Cultivo bifásico en dos sustratos (maíz y arroz) con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y ácido Láctico en dos concentraciones (100 y 200 µl), 3) cuantificación del porcentaje de huevos de *N.aberrans* parasitados por el hongo y 4) probar su efectividad biológica bajo condiciones de invernadero. La primera prueba consistió en la inoculación en fase líquida de crecimiento micelial de 21 días de *P.chlamydosporia* en tubos de ensaye con Caldo Sabouraud Dextrosa (SDC) y el conteo cada 12h, por un periodo de 8 días de muestras de biomasa del hongo (esporas, fragmentos de micelio, blastoesporas), obteniéndose un crecimiento exponencial en la formación de esporas en medio liquido de 2.6×10^{10} UFC (unidades formadoras de colonias) $\text{ml}^{-1} \pm 4.5$ al tercer día de cultivo. Para la evaluación de crecimiento bifásico fueron utilizados matraces de 250ml con sustrato de arroz y maíz (50g) colocando 100 y 200µl de EDTA y Ac. Láctico (1 molar), estos fueron inoculados con el hongo y se realizó un conteo a los 14 días, presentando un mejor resultado el tratamiento con EDTA (100 µl) con 1.8×10^9 UFC g^{-1} en sustrato de maíz y arroz con ac. Láctico (200 µl) teniendo 1.8×10^9 UFC g^{-1} , siendo los testigos los que produjeron menor número de UFC con 3.9×10^8 UFC g^{-1} para el sustrato con arroz y 9.4×10^7 UFC g^{-1} en maíz. El aislamiento del hongo parasito el 86% de los 200 huevos previamente desinfectados que se depositaron en placas con crecimiento de *P. chlamydosporia* de 5 repeticiones.

Se probaron tres estrategias de control para *N.aberrans* en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum* L): a) cultural (Biofumigación; incorporación de fragmentos de brócoli con dosis de aplicación de 2.9 T y 1.5 T estiércol de vaca por 1000 m², humedecido y cubierto con plástico), b) biológico (hongo nematófago *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a una concentración de $2.6 \times 10^9 \pm 1.8$ UFC ml^{-1} y quitina-BioQuitina® con dosis de 1kg por 382 m², disuelta en agua como vehículo), c) químico (aplicación de oxamil 42%, en una dosis de 1kg por 382 m², aplicado a los 15 días posteriores al trasplante en sistema de riego por goteo) así como la combinación de algunos tratamientos (Biofumigación + *P. chlamydosporia*, Biofumigación +

Quitina, Biofumigación + Quitina + *P. chlamydosporia*). Se realizaron evaluaciones de altura, peso seco y fresco de raíz y follaje e índice de agallamiento durante los 30, 60, 90, 120 y 150 dpt. Los tratamientos que tuvieron como base la aplicación de biofumigación, aumentó la altura, peso en biomasa y redujo el índice de agallamiento en las cinco evaluaciones realizadas en comparación con el testigo absoluto. Siendo la combinación de todos los tratamientos biológicos (Biofumigación+ BioQuitina®+ *P. chlamydosporia*) el que dio mejor resultado en las variables evaluadas, con un índice de agallamiento (IA) de 1 en escala de severidad, con una reducción del 70% en agallamiento, por consiguiente menor biomasa con 3.4 g en peso seco de raíz (PSR), aumento de biomasa en peso seco de follaje (PSF) con 155g y el segundo con mejor altura de la plántula con 155cm, en las medias obtenidas de las cinco evaluaciones. El segundo tratamiento con mejor respuesta fue BQ con una altura de 222 cm a los 150 dpt y IA de 2 en escala de severidad, con una reducción del 71% de agallamiento. Obteniendo la mayor biomasa con 31g en PSF de la media obtenida para las cinco evaluaciones. ($\alpha = 0.05$). .

Palabras claves: Falso nematodo agallador, *Pochonia chlamydosporia*, quitina, biofumigación, brócoli, tomate

SOIL DESINFESTATION FOR THE CONTROL OF *Nacobbus aberrans* (Nematoda: Pratylenchidae) USING ORGANIC AMENDMENTS AND BIOLOGICAL REGULATORS.

Ivonne Herrera Yañez.
Colegio de Postgraduados, 2016.

ABSTRACT

In order to find alternative biological control type *N.aberrans* in growing tomatoes in the State of Mexico, sampling was conducted in naturally infested plots with the nematode Coatlinchan in the town of Texcoco. Of the sample, isolation identified as *P.chlamydosporia* var. *chlamydosporia* was obtained. (Gooddard) Zare and Gams.

To this isolation, will perform the following tests: 1) Determination of the phase of growth and spore formation, 2) biphasic culture on two substrates (maize and rice) with EDTA and Ac. Lactic at two concentrations (100 and 200 ul), 3) quantify the percentage of eggs parasitized by the fungus *N.aberrans* and 4) testing the biological effectiveness under greenhouse conditions. The first test consisted of inoculating liquid phase of mycelial growth *P.chlamydosporia* 21 days in test tubes with Sabouraud Dextrose Broth (SDC) and counted every 12 hours for a period of 8 days samples fungal biomass (spores , mycelial fragments, blastospores), yielding an exponential growth in spore formation in liquid medium of 2.58×10^{10} CFU ml⁻¹ \pm 4.5 on the third day. For evaluation of biphasic growth were used 250ml flasks with rice and corn substrate (50g) by placing 100 and 200 ul of EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and Ac. Lactic (1 molar), they were inoculated with the fungus and a count at 14 days was performed, showing a better result treatment with EDTA (100 microliter) with 1.8×10^9 CFU g⁻¹ substrate corn and rice with A . Lactic (200 ul) teniendo 1.76×10^9 CFU g⁻¹, where witnesses who produced fewer UFC with 3.9×10^8 CFU g⁻¹ for the substrate with rice and 9.4×10^7 CFU g⁻¹ in corn. The isolation of the fungus parasite 86% of the 200 previously disinfected eggs were deposited on plates with growth of *P. chlamydosporia*.

Three control strategies *N.aberrans* in growing tomato (*Solanum lycopersicum* L) were tested: a) culture (Biofumigation; incorporation of fragments of broccoli with application rates of 2.9 T and 1.5 T cow manure per 1000 m², dampened and covered with plastic), b) biological

(nematophagous fungus *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* at a concentration of $2.6 \times 10^9 \pm 1.8$ CFU ml⁻¹ and chitin-BioQuitina® doses 1kg per 382 m², dissolved in water as a vehicle), c) chemical (42% oxamyl application at a dose of 1 L ha⁻¹, applied to 15 days after transplant drip irrigation system) as well as the combination of some treatments (Biofumigation + *P. chlamydosporia*, Biofumigation + chitin, chitin + Biofumigation + *P. chlamydosporia*). Dry and fresh root and foliage weight and root-knot index for 30, 60, 90, 120 and 150 days after transplantation. The treatments that were based on the application of biofumigation, increased height, weight in biomass and reduced the root knot index (IA) in the five evaluations performed in comparison with the absolute control. The combination of all the biological treatments (Biofumigation + BioQuitina® + *P. c. var. chlamydosporia*) was the treatment that gave the best result in the variables evaluated, with a root knot index of 1 on severity scale, with a 70% reduction in knots roots, consequently lower biomass in root with 3.4 g in dry root weight (PSR) Increase of biomass in foliage (PSF) with 155g and the second with better height of the seedling with 155cm, in the means obtained from the five evaluations. The second treatment with the best response was BQ with a height of 222 cm at 150 dpt and root knot index (IA) Of 2 on a severity scale, with a 71% reduction in knots root and obtaining the highest biomass with 31g in PSF of the average obtained from for the five evaluations. ($\alpha = 0.05$).

Key words: False root knot nematode, *Pochonia chlamydosporia*, chitin, biofumigation. broccoli, tomato.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados por todos los recursos materiales, infraestructura y sobre todo por el capital humano invertido en mi formación.

A el Dr. Ignacio Cid del Prado Vera por aceptar ser mi consejero particular y darme las herramientas para concluir este trabajo de investigación. Por haber sido paciente, darme sus enseñanzas, consejos y la gran dedicación que me brindo para formarme como profesionista.

A la Dr. Raquel Alatorre Rosas por su apoyo incondicional tanto en la fase académica como de investigación y por haber aceptado ser parte de este comité.

Al Dr. Mario Pérez Grajales y el M.C. Ignacio Pérez Rodríguez por ser parte de este consejo particular y a sus aportaciones a este trabajo de investigación.

A el Técnico Arturo Martínez, por enseñarme mucho de lo que se, su buena disponibilidad y por recibirme gratamente a mi llegada al CP.

M.C. Francisco Franco Navarro por sus acertados consejos para la realización de este trabajo.

A la Dr. María del Pilar por su apoyo académico y personal en este proceso.

A la M.C. Laura Chi por su apoyo incondicional de laboratorio en este trabajo de investigación y amistad.

A mis compañeros y amigos, Elsa Espinoza, Jesús, Anallely, Edith, Claudia, Hugo, Arturito, Raymundo, Solecito, Doña Elena y Don Bata. Muchas gracias.

DEDICATORIA

A Dios por darme vida y oportunidades.

A Margarita Yáñez López por su incondicional amor, por confiar en mí a pesar de todo y por seguir preocupándote y luchando por que sea mejor persona, por tus consejos y comprensión, por ser mi guía.

A Crispín Herrera Yáñez, por escucharme siempre, por su grande amor, por ser mi amigo, por ser unidos, por sus abrazos y sonrisas, por darme una grata niñez, por ser mi papi.

A mis hermanos Lorena siempre estricta y comprensiva, Crispín trabajador y ejemplar, Gaby risueña y responsable, Karla traviesa y alegre, Axel Uriel complemento, por ser mis compañeros de vida, amigos, jueces y abogados, siempre y sobre todo los querré.

A Valeria Melgarejo Herrera mi hermosa sobrina y la sonrisa de todos. Gracias por existir.

A mis amigas Alma Adela y Elizabeth Ortiz, gracias por ser cómplices y consejeras de muchas circunstancias, sobre todo por su cariño.

A Cesar V. Bustillos Aguirre, por querer tomar mi mano y caminar a mi lado, por tu amor y apoyo, por formar una familia junto a nuestra pequeña Frida Gabriela, la hermosa luz que ilumino mi vida, su sonrisa es lo más hermoso que han visto mis ojos.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	xii
INDICE DE TABLAS	xiv
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	1
OBJETIVOS.	1
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	1
1.2 OBJETIVO ESPECIFICOS.....	1
HIPOTESIS.	2

CAPITULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.Cultivo de jitomate.....	4
1.1 Clasificación taxonómica.....	4
1.2 Importancia mundial del cultivo del jitomate.....	4
1.3 Importancia del cultivo de jitomate en México.....	5
1.4 Producción en invernadero.....	6
1.5 Problemática que enfrenta el cultivo de jitomate.....	7
1.6 Problemas Fitosanitarios.....	8
1.6.1 Plagas.....	9
1.6.2 Enfermedades.....	11
2. NEMATODOS.....	17
2.1 <i>Nacobbus aberrans</i>	19
2.1.1 Características morfológicas.....	21
2.1.2 Distribución geográfica en México.....	21
2.1.3 Ciclo de vida.....	22
2.1.4 Sintomatología inducida por <i>N.aberrans</i>	24
2.1.5 Susceptibilidad y gama de hospedantes.....	24
3. Control de Nematodos.....	25
3.1 Variedades resistentes.....	25
3.2 Control Químico.....	25
3.2.1 Fumigantes de suelo.....	27
3.3 Control cultural.....	28
3.3.1 Rotación de cultivos.....	28

3.3.2	Abonos orgánicos.....	28
3.3.3	Solarización.....	29
3.3.4	Biofumigación.....	30
3.4	Control Biológico.....	31
3.4.1	Hongos implicados en el control biológico.....	32
3.4.2	Nematicidas orgánicos.	35
3.4.2.1	Utilización de la quitina y quitosano con efecto nematicida.....	35

CAPITULO II

Pochonia chlamydosporia como agente de control biológico

INTRODUCCIÓN	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
1. Detección de <i>P. chlamydosporia</i>	41
1.1 Detección a partir de raíces (Kerry, 1993, Hidalgo, 2000 modificado por Perez, 2004)	41
1.2 Detección a partir de suelo (Kerry, 1993; Hidalgo, 2000 modificado por Perez, 2004).....	41
1.3 Detección a partir de masas de huevos (Kerry, 1993; Hidalgo, 2000 modificado por Perez, 2004).....	42
2. Identificación morfológica de <i>P. chlamydosporia</i>	42
3. Conservación de <i>P. chlamydosporia</i>	42
4. Propagación de <i>P. chlamydosporia</i> en medio bifásico.	43
4.1 Fermentación líquida (Cruz-Martínez, 2007; Velasco, 2015).....	43
4.1.1 Determinación de la fase exponencial de crecimiento y formación de esporas en el medio líquido.....	43
4.2 Fermentación sólida (Hidalgo, 2000, modificado por (Perez, 2004)).....	44
4.2.1 Cultivo sólido bifásico, formación de clamidosporas por g ⁻¹ de sustrato.....	44
5. Pruebas de <i>P. chlamydosporia</i> como agente de control biológico.....	45
5.1 Obtención de masa de huevecillos de <i>N. aberrans</i>	45
5.2 Prueba de parasitismo de <i>P. chlamydosporia</i> sobre huevos de <i>N. aberrans</i> in vitro.	45
6. Pruebas de quitina (HYTC-concentrado en polvo) como agente de control biológico de huevos de <i>N. aberrans</i>	45
RESULTADOS.	46
1.1 Identificación de <i>P. chlamydosporia</i>	46
1.2 Determinación de la fase de crecimiento y formación de esporas.	47
1.3 Reproducción masiva de <i>P. chlamydosporia</i>	50

1.4	Parasitismo de huevos.....	50
1.5	Reproducción de <i>P. chlamydosporia</i> en medio bifásico con EDTA y ac. láctico.	52
1.6	Inhibición de la eclosión de huevos de <i>N.aberrans</i> con quitina.....	53
	DISCUSIÓN.....	53
	CONCLUSIÓN.....	55

CAPITULO III

Desinfestación de suelo en invernadero, infestado por *N. aberrans* mediante el uso de enmiendas orgánicas y reguladores bilógicos

	INTRODUCCIÓN.....	57
	MATERIALES Y METODOS.....	58
1.	Establecimiento del experimento.....	58
1.2	Biofumigación.....	61
1.3	<i>P.chlamydosporia</i>	61
1.4.	Quitina.....	61
2.	Extracción de nematodos.....	62
3.	Evaluación de plántulas de jitomate.....	62
	RESULTADOS.....	63
1.	Identificación del nematodo agallador en campo.....	63
2.	Escala de severidad.....	63
3.	Evaluación de la fauna nematológica.....	64
4.	Evaluación de población de <i>N.aberrans</i> por tratamiento durante la experimentación.	65
5.	Efecto de los tratamientos en el área foliar.....	66
6.	Efecto de los tratamientos en el Índice de Agallamiento.....	69
	DISCUSIÓN.....	73
	CONCLUSIÓN.....	76
	LITERATURA CITADA.....	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA. 1. Valor de producción mundial por toneladas de jitomate periodo 2008-2012 (FAO, 2013).	5
FIGURA. 2. Valor de producción nacional de jitomate en toneladas por estados en el 2014. SIAP, 2015.....	6
FIGURA. 3. <i>Nacobbus aberrans</i> . 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. pe = poro excretor; icl = incisuras del campo lateral; v = vulva; b = bursa; esp = espícula; f = fasmidio; h = huevecillos (Modificado de Stone y Burrows, 1985).	20
FIGURA. 4. Representación del ciclo biológico de <i>N. aberrans</i> . A) Etapa de embriogénesis, B) Segunda etapa larvaria ataca raíces, C) J2, J3, J4 y hembras jóvenes invaden la raíz como inóculo primario, D) J2 Se alimenta de células puede salir y reinfectar la raíz formando falsos nódulos, 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 contiene hembras ovipositoras fuente de infecciones J, K) Índice de agallamiento. (Agrios G. N., 1996 tomado de Sánchez, 2010).	23
FIGURA. 5	48
FIGURA. 6 . Determinación de la fase de crecimiento de <i>P.chlamydosporia var chlamydosporia</i> , donde se observó la fase exponencial de crecimiento al tercer día, seguida de una declinación de la curva por agotamiento de nutrientes en el cultivo.	49
FIGURA. 7 Crecimiento de <i>P.chlamydosporia var. chlamydosporia</i> en medio sólido de maíz quebrado. A) Bolsa de 200gr. Completamente colonizado. B) granos de maíz colonizado.....	50
FIGURA. 8. Parasitismo de <i>P.chlamydosporia var. chlamydosporia</i> en huevecillos de <i>N.aberrans</i> . A) Huevos rodeados por conidios germinados. (100x) B) Huevos sin parasitar de la prueba control. (100x) C) Masa de huevos colonizado por micelio verticilado. (100x). D y E) Huevo parasitado por micelio. F. micelio. G. huevecillo de <i>N.aberrans</i> . H. conidio.....	51
FIGURA. 9 Producción de UFC de <i>P.chlamydosporia var chlamydosporia</i> en sustrato bifásico a base de maíz y arroz con EDTA y Ac. láctico en dos concentraciones (100 y 200 µl).	52
FIGURA. 10 A y B) Deterioro del corión de huevos de <i>N.aberrans</i> por el efecto de quitina. C) Huevo control.....	53
FIGURA. 11 Proceso de Biofumigación: A) trituración y aplicación de brócoli, estiércol. Mezcla y riego (capacidad de campo). B) Recubrimiento con plástico, C) para la unión de este se utilizó Resistol 5000 y fueron realizadas zanjas para recubrir los extremos de la superficie.	59
FIGURA. 12 .Diseño experimental completamente al azar en la Localidad de San Diego, Texcoco; A) La nave 1 comprende de 15 surcos, B) Mientras que la Nave 2 comprende de 24 surcos.	60
FIGURA. 13. Escala de severidad, realizando con las raíces del lugar de estudio en base a la escalas propuestas por Sikora and Brigend, (1990) y Taylor Sasser (1978).	64

FIGURA. 14 Fauna nematológica antes de la aplicación de los tratamientos y posterior a los tratamientos.....	65
FIGURA. 15. Efecto de la aplicación de los tratamientos en poblaciones de juveniles de <i>N.aberrans</i> (J2) en suelo (200g) de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bajo condiciones de invernadero. Tratamientos: TA= Testigo Absoluto, B= biofumigación, P= <i>P. c. var. chlamydosporia</i> , Q= quitina, B+P= biofumigación+ <i>P. c. var. chlamydosporia</i> , B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q= biofumigación+ <i>P. c. var. chlamydosporia</i> + quitina, TO= Testigo químico (oxamil).dpt=días posteriores al trasplante.....	66
FIGURA. 16 Efecto de la aplicación de varios tratamientos sobre la altura en tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bajo condiciones de invernadero. Tratamientos: TA= Testigo Absoluto, B= biofumigación, P= <i>P. c. var. chlamydosporia</i> , Q= quitina, B+P= biofumigación+ <i>P. c. var. chlamydosporia</i> , B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q= biofumigación, TO= Testigo químico (oxamil).dpt=días posteriores al trasplante.	68
FIGURA. 17 Efecto de la aplicación de varios tratamientos sobre el peso fresco de follaje en tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bajo condiciones de invernadero. Tratamientos: TA= Testigo Absoluto, B= biofumigación, P= <i>P. c. var. chlamydosporia</i> , Q= quitina, B+P= biofumigación+ <i>P. c. var. chlamydosporia</i> , B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q= biofumigación, TO= Testigo químico (oxamil).dpt=días posteriores al trasplante.....	68
FIGURA. 18 Efecto de la aplicación de varios tratamientos sobre el peso seco de follaje en tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bajo condiciones de invernadero. Tratamientos: TA= Testigo Absoluto, B= biofumigación, P= <i>P. c. var. chlamydosporia</i> , Q= quitina, B+P= biofumigación+ <i>P. c. var. chlamydosporia</i> , B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q= biofumigación, TQ= Testigo químico (oxamil).dpt=días posteriores al trasplante.	69
FIGURA. 19. Efecto de la aplicación de varios tratamientos sobre el peso fresco de raíz en tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bajo condiciones de invernadero. Tratamientos: TA= Testigo Absoluto, B= biofumigación, P= <i>P. c. var. chlamydosporia</i> , Q= quitina, B+P= biofumigación+ <i>P. c. var. chlamydosporia</i> , B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q = biofumigación+ <i>P. c. var. chlamydosporia</i> + quitina, TO= Testigo químico (oxamil).dpt=días posteriores al trasplante. ...	71
FIGURA. 20. Efecto de la aplicación de varios tratamientos sobre cultivo de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bajo condiciones de invernadero. Tratamientos: TA= Testigo Absoluto, B= biofumigación, P= <i>P. c. var. chlamydosporia</i> , Q= quitina, B+P= biofumigación+ <i>P. c. var. chlamydosporia</i> , B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q= biofumigación+ <i>P. c. var. chlamydosporia</i> + quitina, TO= Testigo químico (oxamil).dpt=días posteriores al trasplante.	71

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Principales plagas que afectan cultivos de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	9
TABLA 2. Principales virus que afectan cultivos de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) y su control (Velasco- Hernandez, <i>et al.</i> , 2011; Dominique, <i>et al.</i> , 2011).	12
TABLA 3. Principales hongos que afectan cultivos de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) y su control (Velasco- Hernandez, <i>et al.</i> , 2011; Dominique, <i>et al.</i> , 2011).	14
TABLA 4. Principales bacterias que afectan cultivos de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) (Velasco- Hernandez, <i>et al.</i> , 2011; Dominique, <i>et al.</i> , 2011).	16
TABLA 5. Nematodos que afectan cultivos de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) (Velasco- Hernandez, <i>et al.</i> , 2011).	18
TABLA 6. Control químico de nematodos agalladores en cultivos hortícolas.....	26
TABLA 7. Químicos alternativos utilizados como fumigantes en suelos agrícolas (FAO, 2013).	28
TABLA 8. Tipos de hongos antagonistas de nematodos (Zaki & Mahmood, 1996; Lopez-LLorca & Hans-Borje, 2001)	33
TABLA 9. Determinación de la fase de crecimiento y formación de esporas de <i>P.chlamydosporia</i> var <i>chlamydosporia</i>	49
TABLA 10 Producción de UFC de <i>P.chlamydosporia</i> var <i>chlamydosporia</i> en sustrato sólido a base de maíz y arroz con EDTA y Ac .Láctico en dos concentraciones (100 y 200 µl).....	52
TABLA 11. . Evaluación del Peso seco de follaje, de los tratamientos aplicados sobre plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) crecidas en suelo naturalmente infestado por <i>Nacobbus aberrans</i> en invernadero durante los 30, 60, 90, 120 y 150 días posteriores al trasplante.....	67

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen es uno de los nematodos más importantes por las pérdidas que causa en la producción de hortalizas tales como el chile (*Capsicum annuum* L.), la papa (*Solanum tuberosum*), berenjena (*S.melongena* L.), chícharo (*Pisum sativum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.) y jitomate (*Solanum lycopersicum* Mill). Esta especie de nematodo se ha encontrado en diez estados de la República Mexicana, siendo el jitomate uno de los hospedantes más afectados (Flores-Camacho, *et al.*, 2007; Manzanilla L., *et al.*, 2002; Montes-Belmont, 2000; Cabrera-Hidalgo, *et al.*, 2014; Franco Navarro, *et al.*, 2013; Cristobal, *et al.*, 2001). Diversas estrategias son utilizadas para el combate de poblaciones de nematodos fitoparásitos, sin embargo los de mayor uso son los productos químicos, actualmente el uso de estos productos está restringido, debido a los problema de contaminación ambiental y salud, además del elevado costo que requiere sus aplicaciones continuas, justificandose su uso solo en cultivos redituables (Franco Navarro, 2002) por lo que es necesario buscar alternativas de bajo impacto ambiental y de mejor alcance economico.

OBJETIVOS.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la incorporación individual y conjunta de enmiendas orgánicas mediante el proceso de Biofumigación y de agentes biorracionales como la adición de quitina y *P. chlamydosporia* para la regulación de poblaciones de *N. aberrans*, en el cultivo de jitomate en condiciones de invernadero.

1.2 OBJETIVO ESPECIFICOS.

1. Evaluar las características de crecimiento, esporulación en cultivo bifásico (líquida y sólida) para la formación de clamidosporas de *P. chlamydosporia*.
2. Evaluar en laboratorio el parasitismo de *P. chlamydosporia* sobre huevos de *N.aberrans*.

3. Evaluar la eficiencia de quitina como supresor del nematodo *N.aberrans*.
4. Evaluar la eficiencia de la combinación de tratamientos en invernadero, seleccionando el mejor tratamiento para la reducción de la población en un suelo infestado por *N. aberrans*.

HIPOTESIS.

La incorporación de enmiendas orgánicas bajo el proceso de Biofumigación en el suelo, de quitina y de *P. chlamydosporia*, reducirá el índice de agallamiento, beneficiando así la producción de jitomate cultivado bajo condiciones de invernadero.

CAPITULO I.
REVISIÓN DE LITERATURA.

1 Cultivo de jitomate.

1.1 Clasificación taxonómica.

El jitomate (tomate rojo) *Solanum lycopersicum* L., pertenece a la familia de las solanáceas, es originario de América del Sur, especialmente Perú y las Islas Galápagos, también de Bolivia, Chile, Ecuador y México; en este último país, es considerado el principal centro de domesticación (ICAMEX, 2005).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida, Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum lycopersicum* L.

1.2 Importancia mundial del cultivo del jitomate.

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las verduras frescas ampliamente consumidas en el mundo (Davila Aviña, *et al.*, 2011), considerado el segundo vegetal más importante después de la papa, debido a su alto contenido balanceado de minerales y vitaminas (C y E) como de carotenos y flavonoides, teniendo importancia industrial y medicinal.

La extensión que ocupa el cultivo del jitomate a nivel mundial es de 4 803 680 hectáreas, que han llegado a producir 161 79 millones de toneladas, según los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), correspondientes al año 2012, última cita oficial de estadística disponible a nivel mundial.

China es el primer productor en el mundo, con 50 125 055 toneladas, el 23.75 por ciento del total. A China le sigue India como segundo productor mundial de tomate, con un total de 17 500 000 toneladas (8,29 %). El tercer lugar lo ocupa Estados Unidos con 13 20 950 toneladas (6,26 %). El cuarto lugar en el ranking de productores mundiales de jitomate está ocupado por Turquía, con 11 350 000 toneladas (5,38 %). Egipto ocupa la quinta posición con 8 625 219 toneladas (4,09%), país al que siguen Irán con 6 000 000 toneladas (2,84%), Italia con 5 131 977 toneladas (2,43%), España con una producción de 4 007 000 toneladas (1,9%), Brasil en novena

posición con 3 873 985 toneladas (1,83%), apareciendo México en el décimo lugar con una producción de 3 433 567 toneladas, cifra que supone el 1,63 por ciento de la producción mundial de tomate fresco (FAO, 2013).

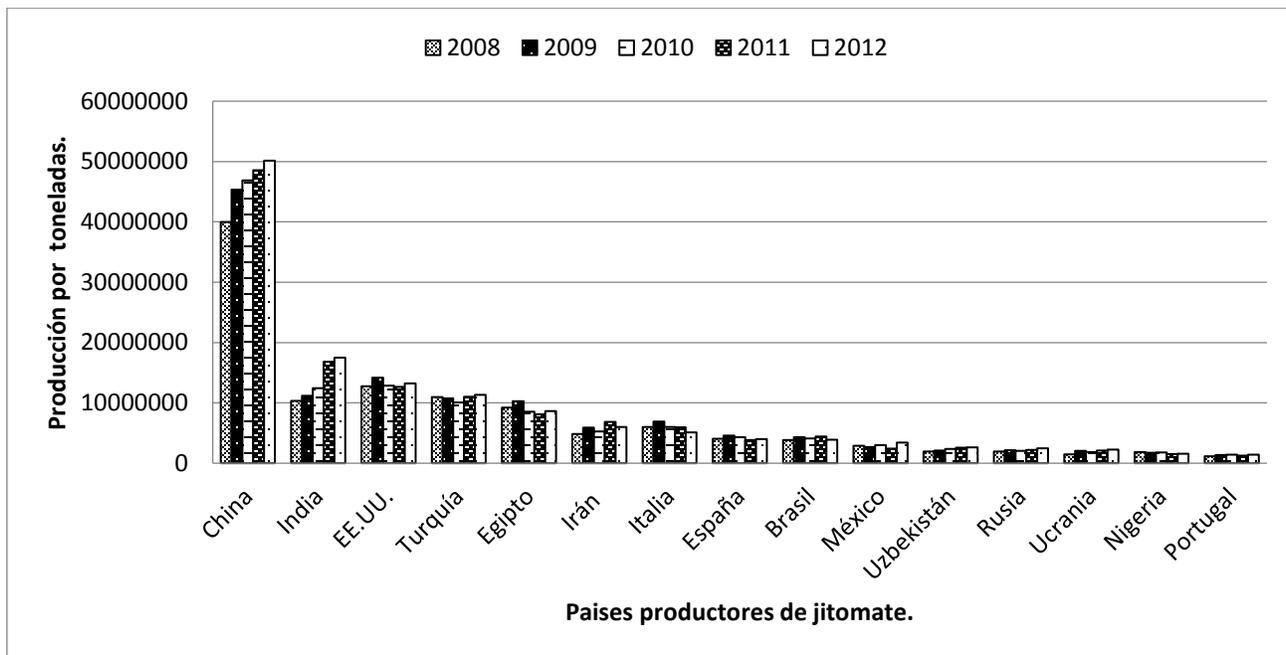


FIGURA. 1. Valor de producción mundial por toneladas de jitomate periodo 2008-2012 (FAO, 2013).

1.3 Importancia del cultivo de jitomate en México

En México durante el ciclo agrícola 2014, según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) cosecha hasta febrero de 2015 se obtuvieron 2.4 millones de toneladas de tomate rojo, el cual contempla la producción de tomate saladette y tomate bola, mejor conocido en el centro y sur de México como jitomate, dicha producción representa una disminución en la producción de este producto en un 9% respecto a la producción reportada que fue de 2.7 millones de toneladas. En los últimos ocho años se han sembrado y cosechado entre 48 a 55 mil hectáreas de tomate rojo en todo el país, con rendimientos que van desde las 37 a 57 toneladas por hectárea, siendo así el 2012, el año en que se obtuvo la mayor producción, que fue de 2.8 millones de toneladas, con rendimientos promedios de 51.54 toneladas por hectárea (SIAP, 2014). De acuerdo con el informe que publico el SIAP durante el año agrícola 2014, los principales estados productores de tomate rojo fueron: Sinaloa con una producción de 550, 900 toneladas con rendimientos por hectárea de 40.5 toneladas y un valor de producción de 33 708

194.57 pesos ; San Luis Potosí con una producción de 196, 011 toneladas con rendimientos de 74 toneladas por hectárea y valor de producción de 11,399,933.32 ; Michoacán con una producción de 163, 425 toneladas y rendimientos de 27.8 toneladas por hectárea y valor de producción de 46,131,013.90 ; Jalisco produjo 158, 408 toneladas con rendimientos por hectárea de 70 toneladas y un valor de producción de 39, 108,876.16; y Zacatecas con una producción de 145, 907 toneladas con rendimientos de hasta 54 toneladas por hectárea y valor de producción de 12,130,213.63 (SIAP, 2015).

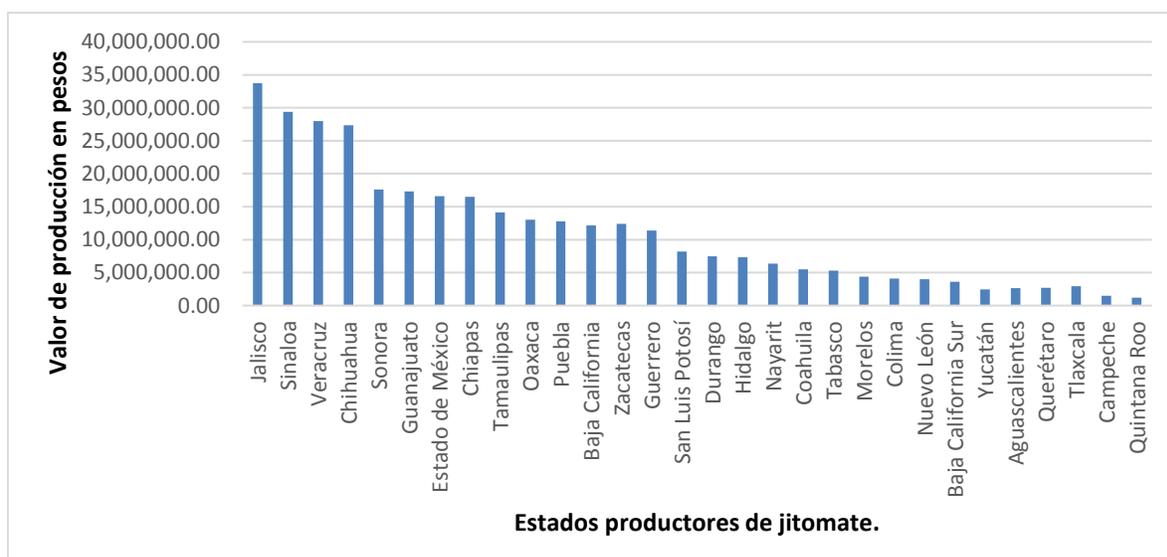


FIGURA. 2. Valor de producción nacional de jitomate en toneladas por estados en el 2014. SIAP, 2015.

En cuanto al rendimiento, destacan Sinaloa, Jalisco, Veracruz y Chihuahua, todos estos estados por encima del promedio nacional.

1.4 Producción en invernadero

Como sistema de producción, el uso de invernadero se ha venido generalizando en los últimos años y se ha ubicado dentro del esquema agricultura protegida, que se caracteriza por un mayor control de factores de riesgo y el incremento de la productividad al intensificar el tiempo y espacio de la unidad productiva (Velasco- Hernandez, *et al.*, 2011).

La principal ventaja que ofrecen los cultivos protegidos es la capacidad que confieren al usuario de modificar a conveniencia determinadas condiciones climáticas, y contrarrestar los

efectos negativos derivados del medio ambiente en forma de precipitación, vientos o plagas. Los rendimientos en invernadero o malla sombra son superiores a los obtenidos a campo abierto, puesto que la planta trabaja en ambientes más húmedos donde las temperaturas fluctúan con moderación, las corrientes de aire son más débiles y la incidencia de plagas es menor que en ambientes descubiertos. A todas estas ventajas inherentes a cualquier invernadero o malla sombra, se le deben sumar las derivadas de un buen manejo del sistema productivo para modificar a conveniencia, las condiciones del ambiente vegetal de manera que repercutan en una mejora del rendimiento final.

Los invernaderos, finalmente, son estructuras de apoyo a la producción agrícola; y deben usarse como parte fundamental de un sistema productivo constituido por una serie de elementos, igualmente importantes para aumentar los rendimientos. Los invernaderos por sí solos no son una solución universal a los problemas que enfrenta la agricultura mexicana. Como estructuras para proteger cultivos son herramientas modernas que impulsan el desarrollo de la agricultura, basadas en una serie de tecnologías que definen la agricultura de precisión, como parte de los métodos modernos de producción empleados en la agricultura tecnificada.

1.5 Problemática que enfrenta el cultivo de jitomate.

Existen diversos factores que afectan el rendimiento y productividad, de diversos cultivos en los que se encuentran los climáticos, que afectan principalmente a campo abierto donde estas condiciones no son controladas (las lluvias, heladas y vientos fuertes). Una de las formas o medios de remediar esta situación es la construcción de invernaderos.

La construcción de invernaderos representa una inversión relativamente alta, que en la actualidad solo se justifica para cultivos a redituables como las hortalizas, frutales y especies ornamentales. El cultivo y manejo de plantas en invernadero depende por completo del hombre, por ello es necesario una capacitación apropiada para productores, técnicos y trabajadores para un mejor desarrollo en sus funciones. Los gastos de operación y algunos de los costos de insumos, como semillas y fertilizantes, son más altos que los mismos productos utilizados en cultivos a campo abierto en la misma superficie. Sin embargo, los rendimientos obtenidos bajo los invernaderos

son mayores si el cultivo se atiende bien, situación que permite obtener mayores ganancias por unidad de superficie (Velasco- Hernandez, et al., 2011).

La falta de financiamiento, es un riesgo en el momento de sembrar, la falta de recursos económicos, afecta las decisiones de cuanto producir. Los incrementos constantes en el precio de insumos, encarece los costos de producción y disminuye el ingreso de los productores.

La sobre oferta y baja en el precio del tomate en el mercado, afecta el ingreso del productor, la variabilidad de precios representa una incertidumbre en el mercado. La falta de formalidad en los comisionistas, afecta el ingreso de los productores de tomate, la falta del pago oportuno y justo repercute en pérdidas económicas.

1.6 Problemas Fitosanitarios.

El manejo fitosanitario de los cultivos comprende una red de interacciones tan compleja que es difícil anticipar en qué momento se presentará un brote infeccioso o el incremento en la población de una plaga o enfermedad, por lo que es indispensable considerar las medidas que se deben tomar para evitar pérdidas significativas en la producción. Entre las variables más importantes involucradas en estas interacciones, se encuentran los factores abióticos: como la temperatura, la precipitación y la humedad relativa; en los factores bióticos se encuentran: la condición fisiológica del cultivo, representada por la etapa de desarrollo, la nutrición, etc. y las que son intrínsecas al organismo dañino, esto es la población inicial o presión de inóculo, el estadio de desarrollo, todos determinan la magnitud en el efecto sobre la enfermedad variando significativamente entre regiones y años (SAGARPA, 2015).

En el cultivo de jitomate, ya sea para cultivo a campo abierto o en invernadero, se presentan diversos problemas fitosanitarios en los que destacan las altas poblaciones de mosquita blanca y ácaros en parcelas, afectando la productividad, con pérdidas que oscilan de un 5% hasta 50%. Entre las enfermedades que están mayormente representadas son los hongos como *Fusarium oxysporum*, cenicilla (*Leveillula taurica*), *Phytophthora capsici* y *P.infenstans*; bacterias (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*), virus (*Virus de la marchitez manchada*) y nematodos (*Meloidogyne* spp. y *Nacobbus aberrans*), que afectan el rendimiento del cultivo en cuanto a su producción y vida en anaquel (Tabla 1). Todos estos problemas orillan al uso de

agroquímicos para controlar las infestaciones, teniendo como resultado el desgaste de suelos y contaminación de frutos y acuíferos. Por ello, que en la actualidad la producción agrícola y en particular la sanidad vegetal, se enfocan cada vez más en estrategias de manejo integrado apoyadas con la adecuada información, las cuales han mostrado que pueden ser de gran utilidad para incrementar la productividad de los cultivos y para aminorar la contaminación y el impacto ambiental (Syngenta, 2016; Castro, 2015; CESAVEG, 2016).

1.6.1 Plagas.

La identificación de la plaga y el conocimiento de sus requerimientos ambientales son fundamentales, ya que el método de control difiere no solo entre especies si no entre variedades. El muestreo permite identificar y cuantificar la población, con los cuales se pueden tomar decisiones de aplicar o no, una estrategia de control. Existen diferentes métodos de control de plagas que se pueden aplicar para regular las poblaciones, las cuales se pueden clasificar en métodos preventivos (prácticas culturales y legales, enemigos naturales) y curativas o correctivas basadas en control químico (Ramirez, *et al.*, 2009).

TABLA 1. Principales plagas que afectan cultivos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Dominique, *et al.*, 2011; Velasco- Hernandez, *et al.*, 2011).

PLAGA	DAÑOS	CONTROL
Mosquita blanca (<i>Trialeurodes vaporariorum</i> y <i>Bemisia tabaci</i>)	<p>Directo: ninfas y adultos se alimentan en el envés de las hojas succionando la savia, presentando una clorosis marcada y como consecuencia detiene su crecimiento; caída las hojas.</p> <p>Indirecto: Los insectos producen sustancias azucaradas, en la que frecuentemente se desarrolla fumagina. Que evita la correcta fotosíntesis.</p> <p>La transmisión de virus (TYLCV, TSWV y CYSDV). Dispersión: Se dispersa a largas distancia por corrientes de aire y en material infestado con huevecillos, ninfas y adultos.</p>	<p>Cultural: Uso de mallas antiáfidos, eliminación de malas hierbas fuera y dentro del invernadero, no tener cultivos de diferentes etapas fenológicas en el mismo invernadero, poda a tiempo de chupones ya que los prefieren para alimentarse y trampas cromáticas.</p> <p>Biológico: Isaria (<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>, Impide®, solución de ajo, solución de ruda molida y detergente biodegradable (Roma).</p> <p>Químico: Imidacloprid, Endosulfan, Bifentrina, ThiamethoxA.</p>

<p>Psilido del tomate o pulgón saltador. (<i>Bactericera cockerelli</i>)</p>	<p>Directo: Decremento del crecimiento de las plantas. Enrollamiento, de hojas engrosamiento y rompimiento, acortamiento de entrenudos, aborto de flores y muerte prematura.</p> <p>Indirecto: Transmisión de toxinas o de fitoplasmas, estos pueden producir manchas de color morado en los bordes y posteriormente un amarillamiento con áreas necróticas.</p> <p>Dispersión: Este organismo se dispersa volando en estado adulto, y en material vegetal (plántula, plantas y restos de podas) en estado de huevecillos, ninfas y pupas.</p>	<p>Cultural: Usar mallas antiáfidos, eliminar malezas dentro y fuera del invernadero, revisar la presencia de pupas o ninfas en las plántulas antes del trasplante y poda.</p> <p>Químico: Abamectina, Thiamethoxam, Spiromesifen, Pymetrozina y Endosulfán.</p>
<p>Minador de la hoja. (<i>Liriomyza spp.</i>)</p>	<p>Los daños son ocasionados por larvas que se alimentan en la parte media de las láminas de las hojas; producen galerías de color blanquecino. En altas infestaciones afectan la capacidad fotosintética de las hojas.</p> <p>Dispersión: Pueden entrar volando.</p>	<p>Cultural: Eliminar malezas dentro y fuera del invernadero, podar hojas minadas y quemarlas y uso de trampas (plásticos amarillos).</p> <p>Químico: Abamectina, Deltametrina y Círomazina.</p>
<p>Gusano del fruto (<i>Heliothis virescens y Helicoverpa</i>)</p>	<p>Las larvas causan daño al alimentarse de los frutos en cualquier estado de desarrollo, cuando son frutos pequeños los devoran totalmente y en frutos grandes hacen un orificio de entrada para alimentarse por dentro; también puede dañar los brotes tiernos y hojas.</p> <p>Dispersión. Los adultos pueden poner huevecillos en plantas en crecimiento. Los huevecillos o larvas pueden pasar de una planta infestada a otra sana.</p>	<p>Cultural: Mallas anti áfidos, usar caseta sanitaria, eliminar maleza dentro y fuera del invernadero y eliminar residuos de podas.</p> <p>Químico: Metomilo y Deltametrina.</p>
<p>Araña roja o acaro de las manchas. (<i>Tetranychus urticae</i>)</p>	<p>Manchas o puntos claros, produciendo decoloraciones o manchas amarillentas que se observan principalmente en el envés de la hoja. Cuando hay altas infestaciones es posible observar los ácaros en el haz y envés de la hoja, como también telarañas en tallos, hojas y pedúnculos.</p> <p>Dispersión: A través de material infestado con ácaros en estado adulto, en plántulas residuos de poda, herramientas, cajas, animales y en ropa de trabajadores.</p>	<p>Cultural: Eliminar malezas dentro y fuera del invernadero, eliminar restos de podas, evitar excesos de nitrógeno y desinfestación del cultivo al final de cada ciclo.</p> <p>Químico: Abamectina, Dicofol,</p>
<p>Acaro del bronceado del tomate (<i>Acaloups lycopersici</i>)</p>	<p>Los daños se inician en la parte inferior de la plántula presentando un aspecto bronceado, toman un color amarillo por el haz y un aspecto acartonado, luego acaban por secarse. En frutos, la epidermis se vuelve áspera y de color rojo castaño.</p> <p>Dispersión: A través de materiales infestados, residuos de poda, herramientas, cajas, animales y en ropa de trabajadores.</p>	<p>Químico: Bifentrina y Aceites vegetales.</p>

1.6.2 Enfermedades.

La enfermedad en plantas es cuando una o varias de sus funciones son alteradas por organismos patógenos o por determinadas condiciones del ambiente en que se desarrolla. Esta alteración llega a ser significativa (evidente) y es continua. Las células y tejidos afectados comúnmente se debilitan y/o destruyen a causa de los agentes que producen la enfermedad, por lo tanto, la capacidad de estas células para llevar a cabo sus funciones normales disminuye o se anula por completo, como resultado la planta muere o disminuye su crecimiento. En contraste existe otro grupo de enfermedades que estimulan a las células a dividirse más (hiperplasia) o a crecer mucho más (hipertrofia). Estas células dan origen a crecimientos anormales y desordenados de tejidos que absorben muchos nutrientes y presionan el tejido vascular adyacente.

Para que se produzca la enfermedad se requiere de la interacción de tres factores a través del tiempo: hospedante (planta), patógeno (agente causal de la enfermedad) y ambiente (entorno físico químico).

El cultivo de tomate es una especie muy susceptible al grupo de organismos fitopatógenos, en donde la fisiología y desarrollo de la planta es afectado. Por ejemplo, en cultivos fuertemente contaminadas por los hongos (*Thielaviopsis basicola* y *Rhizoctonia solani*) o bien por los nematodos (*Meloidogyne spp.* y *Nacobus aberrans*); las plantas, que se enfrentan al inoculo presentes en el suelo, sufren alteraciones radiculares y/o una invasión vascular que perturba su desarrollo, y reducción de crecimiento.

VIRUS.

Los virus son agentes infecciosos que usualmente consisten de material genético, ADN (ácido desoxirribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico) con una cubierta de proteína, de tamaño microscópico, son parásitos obligados que solo se multiplican en el interior de las células del hospedante, con formas diversas, pero a menudo se describen como: varillas rígidas o flexibles; baciliformes y esféricos (isométricos o poliédricos). Los virus que infectan a las plantas penetran en las células por: heridas producidas mecánicamente, propagación vegetativa, semilla, por ciertos vectores o bien cuando un grano de polen infectado se deposita en un óvulo. Los virus producen síntomas como enanismo o achaparramiento, mosaicos, manchas anulares,

enrollamiento foliar, amarillamiento, roya, sarna, enación, tumores, picadura del tallo, picadura del fruto y aplanamiento y deformación del tallo (Agrios, 2005).

Las enfermedades ocasionadas por virus producen pérdidas económicas graves, ya que disminuyen la productividad y calidad de los productos agrícolas. Las pérdidas pueden ser catastróficas, moderadas o insignificantes. No hay químicos efectivos comercialmente para controlar las enfermedades causadas por virus. El control se debe basar en saneamiento, eliminación de las plantas enfermas y control de los insectos vectores, estos últimos mediante mallas e insecticidas.

TABLA 2. Principales virus que afectan cultivos de jitomate (*Solanum lycopersicum L.*) y su control (Velasco-Hernandez, *et al.*, 2011; Dominique, *et al.*, 2011).

ENFERMEDAD	SINTOMAS	TRANSMISIÓN	CONTROL
<i>Mosaico del virus del tomate</i> (ToMV)	<ul style="list-style-type: none"> - Aclareo de los nervios del limbo, jaspeado, mosaico en zonas verdes, amarillas o blancas sobre foliolos jóvenes. - Deformaciones foliares y una reducción del limbo que toma el aspecto de un cordón de zapato (shoestring). - Manchas, alteraciones necróticas que comienzan en lo foliolos y se extienden a el tallo y el ápice de la planta. - En frutos se pueden ver anillos cloróticos, severas lesiones necróticas, circulares y en relieve. 	<ul style="list-style-type: none"> - Transmisión por contacto y por las semillas. - Vector: Pulgones en modo no persistente. Más de 90 especies son capaces de adquirirlo y transmitirlo: <i>Myzus persicae</i>, <i>Aphis gossypii</i>, <i>A. craccivora</i>, <i>A. fabae</i>, <i>Acyrtosiphon pisum</i>, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> -Usar semilla certificada. -Monitorear la presencia de mosquita blanca y pulgón. -Uso de malla anti áfidos. -Eliminar maleza dentro y fuera del invernadero. -Eliminar restos de poda. - Desinfectar periódicamente herramientas con cloro 5% v/v. -Desinfección de sustrato. - Eliminación de plantas infectadas y colocarlas en bolsas antes de sacarlas del invernadero.
<i>Virus del mosaico del pepino</i> (CMV)	<ul style="list-style-type: none"> -Filimorfismo en los foliolos de las hojas. -Deformación y mosaico de color verde claro y verde oscuro, y manchas abolladas. -Achaparramiento. -En el peciolo de las hojas produce manchas abolladas en forma de anillos, de color amarillo y rojo. 	<ul style="list-style-type: none"> Vector: <i>Myzus persicae</i> y <i>Aphis gossypii</i> (altas temperaturas a más de 25°C). Forma no persistente. 	<p>QUIMICO. Aplicación de productos como: SPECTRUM®PAE F Isarias (<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>), para el control del vector, alternado con Impide® o SAFTSIDE®.</p>
<i>Virus Y de la papa</i> (PVY)	<ul style="list-style-type: none"> -Jaspeado o coloración blanquecina sobre los foliolos, amarillamiento intervenal que se transforma en manchas necróticas sobre el haz de la hoja. -Manchas necróticas con reflejo metálico en el envés. 	<ul style="list-style-type: none"> Vector: <i>Myzus persicae</i>, <i>Aphis gossypii</i> y <i>Aphis citricola</i> (altas temperaturas a más de 25°C). Forma no persistente. 	
<i>Virus mosaico de la alfalfa</i> (AMV)	<ul style="list-style-type: none"> -Amarillamiento y necrosis en la base de los foliolos. -En frutos verdes producen 	<ul style="list-style-type: none"> Vector: <i>Myzus persicae</i> y <i>Aphis gossypii</i> (altas 	

	manchas irregulares a circulares, abolladas y ligeramente hundidas y de color pardo que cubren toda la superficie y termina con coloración necrótica.	temperaturas a más de 25°C). Forma no persistente.	
<i>Virus mosaico del tabaco</i> (TMV)	- Mosaico en hojas. -Ligero filomorfismo, abolladuras, deformaciones, necrosis pardas en las venas y tejidos cercanos. -En frutos produce manchas irregulares o semi-circulares, color café pardo, hundidas necrosadas. -Mosaico con zonas de color verde y rojo.	- Uso de semilla contaminada. - Altas temperaturas (más de 25°C).	
<i>Virus de las hojas amarillas en cucharada del tomate</i> (TYLCV).	-Se produce un aspecto raquíutico y arbustivo de la planta, con hojas y folíolos pequeños. -Los bordes de la hojas se curvan hacia arriba dándole a la hoja forma de cuchara.	Vector: <i>Bemisia tabaci</i> . Temperaturas altas (más de 25°C).	

HONGOS

Organismos eucarióticos heterótrofos, pueden ser uni o multicelulares, Las paredes celulares están formados por quitina. La reproducción puede ser asexual o sexual, principalmente por esporas. Se reproducen principalmente por medio de esporas, que son diseminadas por el viento y pueden ser sexuadas o asexuadas.

Las enfermedades causadas por hongos producen en sus hospederos una amplia variedad de diferentes síntomas. Entre otros los hongos fitopatógenos pueden producir manchas cloróticas y necróticas, cribados, canchales, tizones, podredumbres húmedas o secas, momias, agallas, abolladuras, costras, ahogamientos, marchitamientos y pústulas. Los hongos atacan las plantas hospederas susceptibles a través del movimiento de sus estructuras reproductivas. Las esporas se diseminan fácilmente por medios mecánicos, corrientes de aire y el agua, por ejemplo: los hongos se transfieren fácilmente de los sustratos o suelos contaminados a las plantas o partes de estas, por lo que es necesario eliminarlas ya que son fuente de inóculos de transmisión de la enfermedad (Agrios, 2005).

TABLA 3. Principales hongos que afectan cultivos de jitomate (*Solanum lycopersicum L.*) y su control (Velasco-Hernandez, *et al.*, 2011; Dominique, *et al.*, 2011).

ENFERMEDAD	SINTOMAS	DISEMINACION	CONTROL
<i>Phytophthora infestans</i> (Tizón tardío)	<ul style="list-style-type: none"> -Las hojas se doblan en un ángulo de 90°C. -Lesiones son de forma irregular, hundidas, de color verdoso, madurando a color oscuro y teniendo apariencia de papel. -En humedad se observa en el borde de las lesiones un tenue vello algodonoso blanco. -En el tallo aparecen manchas pardas y negruzcas. 	<ul style="list-style-type: none"> -Desprendimiento y acarreo de zoosporas por corrientes de aire. -restos vegetales contaminados, ropa de trabajo y herramientas. -Frutos dañados y actividades de poda, tutoreo, cosecha, etc. -Humedad: 91-100% -Temperatura: 16-22°C. 	<p>Fungicidas de contactos. Clorotalonil. Metalaxil+Mancozeb. Captan. Oxicloruro de cobre. Bicarbonato de potasio. Mancozeb.</p> <p>Fungicidas sistemáticos. Famoxadona+Cymoxanil. Mefenoxam+Clorotalonil. Mefenoxam+Mancozeb. Cymoxanil+Mancozeb. Zoxamide+Cymoxanil.</p>
<i>Alternaria solani</i> (Tizón temprano)	<ul style="list-style-type: none"> -En las hojas aparecen manchas circulares o angulosas de color café a negro pero aumentan de tamaño y forman anillos concéntricos. -En tallos y ramas las lesiones son alargadas con anillos concéntricos. -En frutos las lesiones son hundidos y oscuras con anillos concéntricos. 	<ul style="list-style-type: none"> -Las esporas (conidios) se diseminan con la ayuda del viento, agua, insectos, ropa de trabajadores y maquinaria agrícola contaminados. -Humedad: 70% -Temperatura: 20-25°C. 	<p>Fungicidas de contactos. Clorotalonil. Captan. Oxicloruro de cobre. Bicarbonato de potasio. Mancozeb. Sulfato de cobre pentahidratado.</p> <p>Fungicidas sistemáticos. Azoxystrobin. Zoxamide+Cymoxanil. Mefenoxam+Clorotalonil. Cymoxanil+Mancozeb.</p>
<i>Botrytis gris</i> (Moho gris)	<ul style="list-style-type: none"> -Se secan las flores apareciendo más tarde una cubierta aterciopelada de esporas. -En los tallos aparecen manchas a largadas de color gris y de consistencia aterciopelada. -Los frutos inmaduros de tornan de color verde a café claro o blanco. -en frutos maduros aparecen manchas blancas (circulares) sobre la piel del fruto. 	<ul style="list-style-type: none"> Las esporas (conidios) se diseminan principalmente por efecto de corrientes de aire durante las labores de manejo como poda, tutoreo, cosecha, etc. -Humedad: 70% -Temperatura: 20-25°C. 	<p>Fungicidas de contactos. Oxicloruro de cobre. Bicarbonato de potasio. Mancozeb. Fenhexamid</p> <p>Fungicidas sistemáticos. Mefenoxam+Clorotalonil. Azoxystrobin. Fenhexamid</p>
<i>Phytophthora spp.</i> , <i>Pythium spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Rhizoctonia spp.</i> (Damping off o ahogamiento del tallo).	<p><i>Phytophthora spp.</i> Pudriciones a nivel del cuello de color café oscuro. En plantaciones puede llegar a 10cm y ataca también al follaje.</p> <p><i>Pythium spp.</i> Ocasiona fallas en la germinación debido a que la semilla se pudre. Amarillamiento y marchitez ocasionados por lesiones acuosas y suaves en el cuello de la plántula.</p> <p><i>Fusarium spp.</i> Las plántulas recién emergidas se marchitan (pudrición en el cuello y presencia de un estrangulamiento en el área).</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Plántulas infectadas a nivel del sistema radical. Sustratos y suelos contaminados. -semilla infectada. Materia orgánica en exceso y alta densidad de la planta. -Humedad: alta humedad y mal drenaje del sustrato, poca ventilación o circulación del aire. -Temperatura del sustrato: 12-17°C. PH: + 7. 	

	<p>Amarillamiento comenzando por el borde de las hojas más viejas. Las plantas más afectadas se presentan una necrosis de color café chocolate a nivel del tallo.</p> <p><i>Rhizoctonia spp.</i> Las plántulas recién emergidas se marchitan (lesiones circulares oscuras en el cuello).</p>		
<i>Oidiopsis taurica</i> (Cenicilla).	<p>-En hojas viejas, aparecen manchas verdes amarillentas, casi circulares en el haz de las hojas, posteriormente se deshidratan y toman coloración café. -En alta humedad se observan manchas blancas de color blanco polvoriento.</p>	<p>- Las esporas (conidios) se diseminan principalmente por efecto de corrientes de aire. El hongo sobrevive durante el invierno en residuos de cosecha como micelio, conidio, como Cleistotecios en el suelo.</p> <p>-Humedad: 52 a 72% -Temperatura: 26°C.</p>	<p>Fungicidas de contactos. Bicarbonato de potasio. Sulfato de cobre pentahidratado. Oxicloruro de cobre. Azufre elemental</p> <p>Fungicidas sistemáticos. Myclobutanil Azoxystrobin Trifloxystrobin Triadimenfon.</p>
<i>Cladosporium fulvum</i> (Moho de la hoja)	<p>-Manchas amarillas o verdes claro en el haz de la hoja. -Manchas aterciopeladas de color gris o café pálido compuesto por fructificaciones del hongo, al madurar toman una coloración purpura.</p>	<p>-En condiciones propicias se forman grandes cantidades de conidios que son transportados por el viento, insectos, y el hombre durante las labores de cultivo (poda, tutorio, cosecha, etc.).</p> <p>-Humedad: +95 -Temperatura: 19-21°C.</p>	<p>Fungicidas de contactos. Bicarbonato de potasio. Sulfato de cobre pentahidratado. Oxicloruro de cobre. Azaridactina Azufre elemental Mancozeb.</p> <p>Fungicidas sistemáticos. Azoxystrobin. Sulfato de cobre pentahidratado. Trifloxystrobin</p>
<i>Stemphyllium solani</i> (Mancha gris del tomate)	<p>-Los síntomas se observan en las hojas, peciolo, los tallos pero no en los frutos, se observan manchas irregulares de color café oscuro, ligeramente hundidas y en ocasiones se observa un halo clorótico. -Tiro de munición. -Las hojas se tornan de color amarillo y caen.</p>	<p>-Los conidios se dispersan por corrientes de aire y otros medios para re infectar otras plantas. El hongo sobrevive en residuos de cosecha y suelo.</p> <p>-Humedad: +70% -Temperatura: +25°C.</p>	<p>Fungicidas de contactos. Bicarbonato de potasio. Sulfato de cobre pentahidratado. Trifloxystrobin. Clorotalonil. Mancozeb.</p> <p>Fungicidas sistemáticos. Mefenoxam+Mancozeb. Sulfato de cobre pentahidratado.</p>
<i>Sclerotium rolfsii</i> (Marchitez sureña)	<p>-Produce ahogamiento, pudrición en tallos, raíces semillas o frutos. -Micelio blanco en los tallos que se extienden hacia arriba. -Las partes atacadas son suaves y de color café.</p>	<p>-plantas y suelo contaminado, sobrevive como esclerocios de color castaño oscuro.</p> <p>-Humedad: +70% -Temperatura: +25°C.</p>	<p>Fungicidas de contactos. Quintozeno. Quintozeno+thiram. Pentacloronitrobenzeno.</p> <p>Fungicidas sistemáticos. Benomilo</p>

BACTERIAS

Organismos unicelulares procarionticos autótrofos y heterótrofos, Gram (-) y (+), DNA de forma circular. Con tres formas bacterianas (cocos, bacilos, espirilos), aeróbicos y anaeróbicos. Las bacterias fitopatógenos son unicelulares, microscópicas y no producen esporas. No pueden producir su energía y dependen de una planta hospedera para su sostenimiento. Hay cinco géneros principales: *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (la mayoría de las enfermedades en plantas son causadas por las tres últimas). Estas sobreviven en el tejido por cierto tiempo de forma inactiva y afectan la planta cuando las condiciones ambientales son favorables. Las bacterias se transfieren de una planta a otra por medios mecánicos (en las manos y en los instrumentos de corte) y son comúnmente diseminadas en el agua de salpicado (Agrios, 2005).

TABLA 4. Principales bacterias que afectan cultivos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Velasco- Hernandez, *et al.*, 2011; Dominique, *et al.*, 2011).

ENFERMEDAD	SINTOMAS	DISEMINACION
<i>Pseudomona corrugada</i> (Necrosis de la medula o medula hueca del tomate)	<ul style="list-style-type: none"> -Clorosis de las hojas más jóvenes. -Pierde su turgencia (se marchita) y se colapsa posteriormente. -En el tallo en el punto de unión del primer racimo aparece una lesión superficial pardo oscuro o negra, a veces tiene una extensión de 30cm de longitud. -En cultivos más viejos sobre el tallo existe un desarrollo prolífico de raíces adventicias en el área en que la medula se ha visto más afectada. 	<ul style="list-style-type: none"> -Salpicaduras de agua de plantas infectadas, suelo contaminado, contaminación por herramientas, cajas, rafias, tijeras, guantes, etc.; de forma mecánica durante la poda, tutoreo, cosecha y demás labores del cultivo. -Humedad: +80% -Temperatura: 18 a 24°C.
<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i> (Cáncer bacteriano del tomate)	<ul style="list-style-type: none"> -Los síntomas se aparecen a medida que la planta alcanza su madurez, el primer síntoma se manifiesta en marchitez unilateral en hojas, mientras que en tonos claros pueden extenderse y en la cara externa e la vena central de la hoja, el peciolo y el tallo. -Los síntomas pueden estar divididos en dos tipos: síntomas superficiales, que son resultado de la colonización bacteriana de los tejidos de la superficie, y síntomas sistemáticos, que son resultado de la invasión bacteriana del tejido vascular. 	<ul style="list-style-type: none"> -Semilla, suelo o sustrato y vegetal contaminado. Trabajos culturales, especialmente poda de hojas y brotes. -Exceso de lluvia y fuertes vientos. Puede entrar a la planta por estomas, raíces, a través de heridas en el tejido vegetal y por roce con otras plantas infectadas -Humedad: +80% -Temperatura: 24 a 27°C.
<i>Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria</i> (Mancha bacteriana)	<ul style="list-style-type: none"> -Pequeñas manchas oscuras con bordes bien definidos, también pueden atacar 	<ul style="list-style-type: none"> S u propagación es por semilla, por el viento, por lesiones, por riego por

	tallos, flores y frutos. Volviéndose hundida cambia de color a amarillo o verde claro a negro o marrón y finalmente se necrosa en el centro y en ocasiones se cae.	aspersión, por suelo, herramientas, ropa de trabajo contaminada. -Humedad: +80% -Temperatura: + 25°C, pero se puede presentar bajo condiciones más frescas de temperatura (20 a 21°C).
--	--	--

2 NEMATODOS.

Las pérdidas anuales en todo el mundo causadas por nematodos estiman alrededor de 11% que incluyen todos los granos y legumbres, plátano, yuca, coco, patata, remolacha azucarera, caña de azúcar. La pérdida para la mayoría de otros cultivos de importancia económica (verduras, frutas y cultivos de campo no comestibles) es alrededor del 14%, para un total de más de \$ 80 mil millones de USD al año (Agrios, 2005; Jones, *et al.*, 2011). Por ejemplo, se estima que los nematodos formadores de quiste *Globodera rostochiensis* y *G. pallida*, representan pérdidas aproximadamente de \$ 70 millones de USD por año o 9% de la producción de papa en el Reino Unido (DEFRA 2010). A pesar de que los nematodos parásitos de plantas se encuentran entre las plagas más extendidas, y con frecuencia son una de las más costosas, los datos sobre su impacto económico sigue siendo poco conocido, especialmente para los cultivos que se producen en las zonas pobres, que se sitúan mayormente en climas tropicales y subtropicales, las pérdidas de producción de cultivos atribuibles a los nematodos en estas zonas se estima en un 14.6% en comparación con el 8.8% reportado en los países desarrollados (Jones, *et al.*, 2011).

Los nematodos pueden atacar cultivos y zonas específicas, otros tienen una plasticidad geográfica más amplia, lo cual puede resultar en una mayor variedad de enfermedades, que varían según la región, el continente y el clima.

Los nematodos pertenecen al reino animal, organismos microscópicos pluricelulares la mayoría de forma vermiforme, simetría bilateral, dimorfismo sexual, pseudocelomados y diferentes órganos sensoriales. Sistema digestivo completo (boca con número variable de labios, cavidad bucal, esófago, glándulas esofágicas secretoras de enzimas, intestino con una sola capa celular y ano). Sistema nervioso formado básicamente por un anillo nervioso a nivel esofágico, ganglios ventrales, dorsales y laterales, de los que emanan los troncos nerviosos. Sistema

excretor con canales laterales y transversales, poro excretor ventral. Sistema reproductor: femenino se abre en la vulva, de localización ventral (ano independiente); masculino con cloaca (unión del vaso deferente y recto), un par de espículas con bursa copulatriz de tipo (peloderan, leptoderan y akaroderan) o sin bursa.

El ataque de los nematodos fitopatógenos provoca síntomas en raíces, así como en los órganos aéreos de las plantas. En las raíces es muy común ver nudos, agallas, ramificaciones excesivas y pudriciones, cuando el ataque va acompañado de bacterias o de hongos (Agrios, 2005). Los trastornos radiculares están acompañados con síntomas no característicos como la falta de crecimiento de las plantas. A veces se confunden con carencias nutricionales, ya que los nematodos afectan a las plantas mediante la privación de nutrientes y la alteración de las funciones fisiológicas.

Los nematodos fitopatógenos pueden clasificarse según el tipo de parasitismo que ejercen sobre sus hospederos. Así tenemos:

Endoparásitos: El adulto penetra totalmente en la planta, los huevos se desarrollan dentro y sólo las formas juveniles salen al exterior liberándose al morir la planta. Se alimentan por sincitios o células gigantes. Ejemplos: *Meloidogyne*.

Semi endoparásitos: La hembra adulto se fija a la planta hospedadora, dejando parte del cuerpo expuesto al exterior. Ejemplos: *Heterodera*, *Globodera* y *Pratylenchus*.

Ectoparásitos sedentarios: Introducen únicamente la cabeza en la planta, no suelen desprenderse salvo para la reproducción. Ejemplos: *Tylenchulus* y *Rotylenchulus*.

Ectoparásitos migratorios: Sólo introducen en la planta el estilete. Algunos forman sincitios. Ejemplos: *Hoplolaimus*, *Xiphinema* y *Trichodorus*.

TABLA 5. Nematodos que afectan cultivos de jitomate (*Solanum lycopersicum L.*) (Velasco- Hernandez, *et al.*, 2011).

ENFERMEDAD	SINTOMA	CONTROL
<i>Meloidogyne spp.</i> y <i>Nacobus aberrans</i> (Cuentas de rosario)	Las raíces presentan agallas, poco o nada ramificadas y carentes de pelos radicales, esto produce una deformación y ramificación de sistema radical. Además produce la obstrucción de los tejidos vasculares e impiden la absorción transporte normal de agua y nutriente por las raíces, lo que se traduce en un menor desarrollo de la	Cultural: arrancar las plantas con el sistema radical completo y quemarlas. Tapete sanitario (tapete con cloro del 1-5% v/v o formol al 4% en la entrada del invernadero, esterilización con vapor, solarización, adición de formol al 4% inyectado en el sistema de riego.

	<p>planta y la aparición de síntomas de marchitez, clorosis y enanismo.</p> <p>Dispersión. Se distribuye en el suelo por manchones o líneas y se dispersan principalmente en el agua de riego, sustrato, tierra, herramientas y cualquier medio de transporte de tierra.</p>	<p>Biológico. Los hongos <i>Myrothecium verrucaria</i> (DITERA, 12-24Kg/ha) <i>Paecilomyces lilacinus</i> (NEMA WG, 4-8 Kg/ha), <i>Arthrobotrys spp.</i>, las bacterias <i>Pasteuria penetrans</i>(Thorne) Sayre y Starr, <i>Tsukamurella paurometabola</i> <i>Steinhaus cepa C-924</i> y <i>Bacillus thurigiensis Berliner cepa LBT-24</i> (Hernandez & Hidalgo-Diaz, 2008).</p>
<i>Pratylenchus penetrans</i> (Nematodos lesionadores)	<p>Presencia de lesiones pequeñas, húmedas y amarillentas que pronto se tornan cafés o negras. Estas lesiones aparecen principalmente sobre las raíces jóvenes., causándole la muerte. Las raíces infectadas son frecuentemente invadidas por patógenos de la raíz como <i>Fusarium</i> y <i>Verticillium</i>. Las plantas afectadas crecen pobremente, producen poco rendimiento y con frecuencia mueren antes de llegar a la madurez.</p>	<p>Químico: dicloropropeno dicloropropano, cloropicrina, metam-sodio, aldicarb, profos, profate, ditrapex, dazomet, fenfulfotion, metomilo, carbofuran o fenamifos.</p>
<i>Ditylenchus dipsaci</i> (Nematodo de tallos y bulbos)	<p>Las plantas pueden ser invadidas en cualquier estado de desarrollo, aunque la penetración ocurre en tejido joven. Las plantas pueden presentar achaparramiento. El follaje es retorcido, arrugado y amarillento. Los pecíolos pueden presentar hinchamiento y hendiduras. El cuello de las raíces principales generalmente muestra decoloraciones, surcos o hendiduras.</p>	<p>Cultural: rotación de cultivos no hospedantes., Es necesario remover y destruir los cultivos viejos</p> <p>Químico: fumigación del suelo con mezclas de dicloropropeno-dicloropropano ha dado excelente control. Dos aplicaciones, cada una de 200 litros por hectárea.</p>
<i>Heterodera schachtii</i> (Achmdt) <i>Globodera rostochiensis</i> (Wall.) <i>Behrens</i> <i>Heterodera tabacum</i> (Nematodos de quistes)	<p>Los síntomas en el follaje dependen mucho de la edad de la planta, tiempo de la temporada y temperatura. El primer síntoma es de mala nutrición. El desarrollo de la planta es escaso; algunas presentan marchitamiento y enchinamiento de las hojas. Las plantas afectadas por lo general mueren temprano.</p>	

2.1 *Nacobbus aberrans*.

El género *Nacobbus* Thorne y Allen, 1944 contiene especies de un hábito predominantemente endoparásitos sedentarios, con las hembras hinchadas que habitan en las agallas que se inducen en las raíces de sus huéspedes, el género contiene sólo dos especies válidas: *Nacobbus dorsalis* Thorne y Allen, 1944 y *N. aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. Su reciente

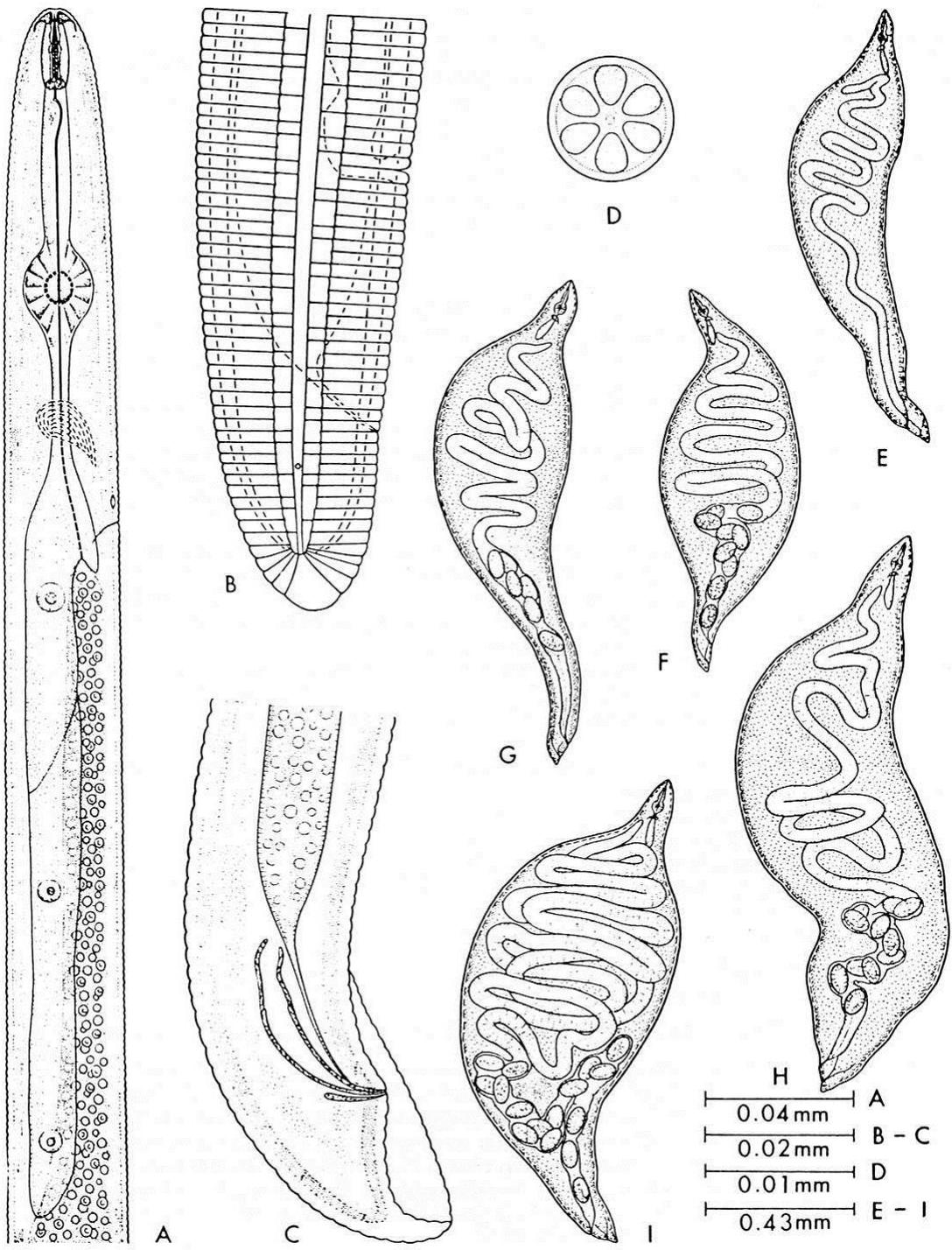


FIGURA. 3. *Nacobbus aberrans*. A. Región esofágica de una hembra inmadura. B. Cola de una hembra. C. Cola de un macho. D-H. Fases de desarrollo de una hembra madura. (Tomado de Sher, 1970).

clasificación indica pertenecer a la Subfamilia Nacobbinae Chitwood & Chitwood, 1950, que se incluye dentro de la Familia Pratylenchidae (Sher, 1944).

2.1.1 Características morfológicas.

El género *Nacobbus* se caracteriza por un fuerte dimorfismo sexual (Fig.3). Hembra joven vermiforme, cerca de 1mm de largo, migratoria en suelo y raíces, cutícula distintivamente anillada, campo lateral con 4 incisuras, aeración irregular. Deridios ausentes. Fasmidios en la región anterior a de la cola. Región cefálica generalmente redondeada, continúa con 3 a 4 anillos. Estilete fuerte de 21-25µm largo. Glándulas esofágicas alargadas, sobrepuestas dorsalmente al intestino. Vulva transversal localizada a un 89-97% a lo largo del cuerpo. Un solo ovario inmaduro, seguido por un oviducto, un útero y este termina en la vulva. Cola corta con punta redondeada.

Hembra madura en forma de saco con ano y vulva subterminal. Útero tubular, ovario largo. Endoparásitos sedentarios en las raíces donde producen agallamiento. El macho es vermiforme, región cefálica fuertemente esclerotizada, estilete largo de 23-27µm. Estructura del esófago similar a la hembra inmadura. Presenta solo un testículo, espículas ventralmente arqueadas. Gubernaculo simple, bursa peloderan o terminal (Bird, 1971).

El J3 pasa a J4 y este estadio es más corpulento y en forma de C, este muda y pasa a formar la hembra joven, la cual es vermiforme, con un primordio genital alargado situado más cerca de la cola que en el macho, el cual es vermiforme y se encuentra frecuentemente embebido en la masa gelatinosa que produce la hembra adulta, la cual tiene forma de saco.

2.1.2 Distribución geográfica en México.

El primer informe sobre la presencia del falso agallador *Nacobbus aberrans* en la República Mexicana, lo hizo Brunner en 1967, quien lo encontró en las raíces agalladas de chile en Chapingo, Estado de México, siendo identificado entonces como *N. serendipiticus*. Actualmente su presencia está documentada en zonas agrícolas de por lo menos 12 estados de la República Mexicana, reportado en los estados de Coahuila, Zacatecas, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí, Tlaxcala y Ciudad de México,

atacando una amplia gama de hospedantes que incluyen a especies de interés agrícola, en donde destacan: jitomate, chile, frijol, betabel y a muchos otros cultivos de importancia económica. En jitomate produce pérdidas a los rendimientos que van del 50 al 100 %, en frijol se señalan pérdidas del 18 al 36 %; las pérdidas cualitativas en cultivos como betabel, zanahoria son cuantiosas, ya que al estar infectados por este nematodos pierden su valor comercial. La dispersión se ha hecho principalmente por plántula infestada, agua de riego, etc. (Flores-Camacho, *et al.*, 2007; Manzanilla L., *et al.*, 2002; Montes-Belmont, 2000; Cabrera-Hidalgo, *et al.*, 2014).

2.1.3 Ciclo de vida.

Nacobbus aberrans se adapta a un amplio rango de temperaturas y tipo de suelos, el ciclo de vida está fuertemente influenciado por la temperatura y muchos aspectos de la ecología que siguen siendo poco conocidos. La capacidad de *N. aberrans* a establecerse en diferentes condiciones ambientales complica su normatividad sanitaria, que está sujeta a la reglamentación internacional fitosanitaria de cuarentena en un esfuerzo por limitar su introducción en otros países (Castillo, *et al.*, 2012; Jatala, 1985).

Las hembras dentro de la raíz, maduran sexualmente y es probable que ahí ocurra la fecundación por los machos, continuando con la ovoposición de huevos, estos son ovales (80µm de largo y 37µm de ancho) con el corion liso y se depositan dentro de la gelatina (posteriormente saco de huevos) con diferentes fases de desarrollo embrionario. El primer estadio larvario (J¹) se obtiene a los 7 días de la primera división celular, esta larva muda (J²) emergiendo del huevo, considerado como el primer estadio infectivo. Este se mueve por la corteza de la raíz, invadiendo las partes laterales de la punta de las raíces primarias o secundarias, ocasionando necrosis de las paredes celulares e hipertrofia. Después de la inducción de estos síntomas ocurre la segunda muda (J³) que ocurre generalmente dentro de la raíz (Cid del Prado, 1985).

La muda a J⁴ hembra o macho puede ocurrir en la raíz o en el suelo aunque, el macho J⁴ está restringido a la corteza de la raíz, al madurar la abandonan. La muda del J⁴ puede tener lugar dentro o fuera de la raíz, siendo vermiformes las hembras inmaduras. Los juveniles pueden retener o mudar su cutícula (Clark, 1965), un rasgo que también se puede observar en los adultos recién mudados de ambos sexos, es que a menudo retienen la cutícula del estadio J⁴, después de

la muda J⁴, el adulto migra al sistema vascular, un movimiento forzado, ya sea por necrosis celular o por células desprendidas dentro de las cavidades ocupadas por los nematodos. La duración del ciclo de vida se ve afectada por la temperatura, la diapausa y el hospedante (Manzanilla L., *et al.*, 2002).

El desarrollo de *N. aberrans* a la etapa adulta ocurre en dos vertientes: (1) después de penetración de las raíces con J², el desarrollo ocurre dentro de la raíz, con emigración repetidas a el suelo hasta que se logren los estadios adultos; (2) después de penetración por el J², el desarrollo puede proceder dentro de la raíz hasta que alcanza la etapa de hembra inmadura joven o de macho (Manzanilla L., *et al.*, 2002).

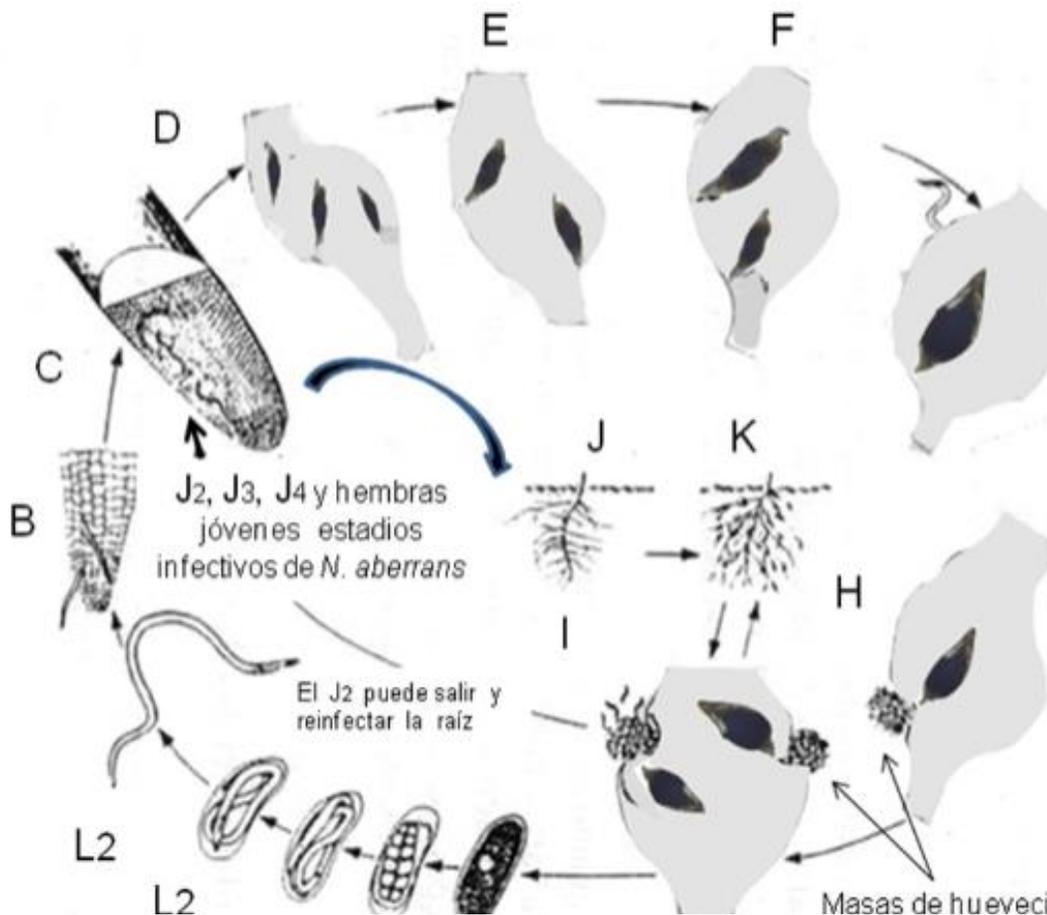


FIGURA. 4. Representación del ciclo biológico de *N. aberrans*. A) Etapa de embriogénesis, B) Segunda etapa larvaria ataca raíces, C) J2, J3, J4 y hembras jóvenes invaden la raíz como inoculo primario, D) J2 Se alimenta de células puede salir y re infectar la raíz formando falsos nódulos, E) Tercera etapa larvaria, F) Cuarta etapa larvaria, G) Nematodos adultos, el macho abandona la raíz, H) Hembra deposita huevos en masa gelatinosa, I) Las agallas contiene hembras jóvenes y maduras. J, K) Índice de agallamiento. (Tomado de Sánchez, 2010).

2.1.4 Sintomatología inducida por *N.aberrans*.

Las plantas hospedantes de este nematodo en general suelen presentar los siguientes síntomas: reducción del crecimiento (achaparramiento), clorosis de hoja, marchitez generalizada súbita (bajo condiciones de poca humedad), caída de flores y frutos, reducción significativa en el rendimiento, la cual se caracteriza por la presencia de frutos pequeños y con poca aceptación en el mercado, necrosis de la raíz, y agallamiento del sistema de raíces (Dominique, *et al.*, 2011).

La formación del sincitium o masa protoplasmática multinucleada, la hipertrofia e hiperplasia de las células corticales y una serie de cambios morfológicos y fisiológicos como son: el engrosamiento de paredes celulares; disolución de paredes celulares; aumentó en tamaño y largo de núcleos; acumulación de almidones e incremento de oxalato de calcio; incremento de la proporción adenina/ácido indolacético y la estimulación de las células del periciclo para reproducirse y dar origen a proliferaciones anormales en la agalla (Cid del Prado, 1985).

2.1.5 Susceptibilidad y gama de hospedantes.

N. aberrans es un nematodo agallador que parasita la mayoría de los cultivos hortícolas como: el Chile (*Capsicum annum L.* y *var. annum*, *C. pendulum L.* y *C. pubescens. L.*), jitomate (*Lycopersicum solanum L.*), frijol (*Phaseolus vulgaris L.*), acelga (*Beta vulgaris L.*), espinaca (*Spinacea oleracea L.*), calabacita (*Cucurbita pepo L.*), betabel (*Beta vulgaris L.*), amaranto (*Amaranthus hybridus L.*), patata (*Solanum tuberosum L.*), zanahoria (*Daucus carota L.* y *D. stramonium L.*), trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum M.*), berenjena (*Solanum melongena*), tabaco (*Nicotina tabacum L.*), chicharo (*Pisum sativum L.*), espinaca (*Spinacia oleracea L.*) y tubérculos andinos (Franco Navarro, *et al.*, 2013; Cristobal, *et al.*, 2001; Yañez-Juarez, *et al.*, 2001; Manzanilla L., *et al.*, 2002). Este nematodo infesta a especies herbáceas o maleza, reportándose las siguientes: Malvona cimarrona (*Anoda cristata L.*), hediondilla (*Cestrum roseum L.*), quinuilla (*Chenopodium álbum L.*), Malva (*Malva parviflora L.*), Periquito (*Mirabilis jalapa L.*), saladilla (*Salsola kali L. var tenuifolia*), hierba mora (*Solanum nigrum L.*), mala mujer (*Solanum rostratum L.*) y tréboles (*Trifolium sp.*) (Manzanilla L., *et al.*, 2002).

3 Control de Nematodos.

Debido a que los nematodos fitoparásitos se mueven muy lentamente, la forma más común para diseminarse es en el transporte de suelos y material vegetativo infectado. El agua, los trabajadores y la maquinaria agrícola pueden llevar los nematodos a distancias considerables, de este modo, el que se establezcan en nuevas áreas depende de que haya un cultivo susceptible y de condiciones ambientales favorables para la reproducción. Frente a estas circunstancias a lo largo de varios años se han implementado diversas estrategias de control que involucran estrategias biológicas, culturales, químicas y genéticas. Cada una de estas ha representado ventajas y desventajas frente a las poblaciones de estos nematodos y su efectividad depende en gran medida a su aplicación y el manejo del cultivo.

3.1 Variedades resistentes.

El sembrar variedades resistentes es el método más conveniente por ser el más económico, efectivo, duradero y no altera el sistema agrícola. Es importante impartir resistencia multigénica a un cultivar de alta producción que posee otras características agronómicas deseables. Además, se deben desarrollar variedades a más de un patógeno (e.g., hongos, bacterias, virus y nematodos). Se ha desarrollado variedades de tomate (Nemared, Nematex, Rotina) resistentes al nematodo nodulador *Meloidogyne incognita* (Velasco Hernandez, *et al.*, 2011) y las variedades de tabaco NC95, Coker 258 y SC22 (Dominique, *et al.*, 2011). Tolerantes a las variedades de Myla, Corvey, Torry y los portainejertos Arnol y Kardia (Syngenta, 2016). Respecto al daño ocasionado por *N.aberrans*, según las variedades comerciales reportadas como resistentes para nematodos como Pink Ripe, Floradade son susceptibles, y solo algunas líneas experimentales como lo reporta (Leyva-Mir, *et al.*, 2013) con registros del 30% de agallamiento se consideran tolerantes.

3.2 Control Químico.

Todos los nematicidas más comunes son productos de uso restringido. El uso de estos compuestos, aunque muy efectivo, tiene sus limitaciones debido a su efecto negativo sobre la estabilidad y complejidad del ecosistema agrícola. Para minimizar este efecto se puede implementar un manejo integrado que incluya aplicaciones ocasionales de nematicidas y el uso de otras prácticas de combate como son: prácticas culturales y control biológico.

Para obtener mayor eficiencia en el uso de nematicidas es necesario preparar el terreno adecuadamente y dejarlo libre de residuos (raíces agalladas). Al momento de la aplicación, el suelo debe tener una humedad adecuada, pero por debajo a la capacidad de campo, a una temperatura de entre 15 a 27°C. Un nematicida ideal afecta el sistema nervioso central y periférico, al inhibir la enzima colinesterasa, alterando la fisiología del nematodo y reduciendo su tasa de reproducción y su nivel poblacional. Los nematicidas más comúnmente usados se clasifican en hidrocarburos halogenados, carbamatos y organofosforados según el ingrediente activo de la formulación.

TABLA 6. Control químico de nematodos agalladores en cultivos hortícolas.

Grupo Químico	Ingrediente Activo.	Producto comercial	Presentación.
Organofosforados - Derivados del Ac.fosforicos - Modo de acción: contacto y sistemático.	Terbufós	TERTO	Granulado.
		SHOT	Granulado.
		BALAZOT	Granulado.
		VIKINGO	Granulado.
		AVANCE	Granulado.
		COUNTER	Granulado.
Fostiazato	Nemathorin 150	Concentración emulsionable.	
Ethopophos	MOCAP	Granulado.	
Fenamifos	Nemacur	Concentrado emulsionable.	
Cadusafos	RUGBY	Suspensión concentrada.	
Carbamatos. - Compuestos derivados del ácido carbámico. - Inhiben la enzima colinesterasa, solubles en agua. - Modo de acción: contacto y sistémico.	Carbofuran.	VELFURAN	Concentrado líquido.
		LUCARFURAN	Granulado.
		FURADAN	
	Oxamil	VYDATE L	Concentrado líquido.
Aldicarb	TEMIK		

El Vydate es otro carbamato cuyo ingrediente activo es el oxamil de acción sistémica y es efectivo para combatir varias especies de nematodos, insectos y ácaros. A nivel comercial existen las formulaciones 10G y Vydate L. En su formulación líquida tiene permiso de uso para combatir plagas en platanos, guineos, solanáceas, cucurbitáceas, piñas, cítricos y ornamentales. Su aplicación es de forma segura para el usuario a través de riego por goteo, creando una zona de protección en las raíces impidiendo que los nematodos y otros insectos del suelo provoquen daños en los cultivos, es fácilmente absorbido por la planta y tiene doble sistemia (es decir:

trabaja de forma ascendente y descendente) de ahí su buena eficacia en el control de diversas plagas del tomate, se metaboliza fácilmente en la planta en sustancias inocuas y es biodegradable por lo que no altera el equilibrio natural del suelo (DUPONT, 2016). Con la aprobación en los valores establecidos para el oxamil por los límites máximos de residuos (L.M.R) y las características antes mencionadas, este es uno de los productos químicos que resulta de mejor utilidad en el ámbito agrícola.

3.2.1 Fumigantes de suelo.

Los fumigantes son sustancias tóxicas que se aplican al suelo en forma de gas, polvo, agentes mojantes o gránulos, para el control de diferentes hongos del suelo, bacterias, nematodos, insectos y malezas. Los fumigantes sólidos, una vez incorporados al suelo, se tornan volátiles de forma que penetran (fumigan) completamente el suelo. Estos compuestos químicos son seleccionados de acuerdo a varias características, tales como el espectro de actividad; capacidad de penetración; período de espera entre tratamiento y plantación; disponibilidad y facilidad de uso; fiabilidad; idoneidad para diferentes condiciones ambientales; costo e impacto ambiental (FAO, 2013)

Los hidrocarburos halogenados son generalmente biocidas fumigantes. El bisulfuro de carbono (CS₂), la cloropicrina y el bromuro de metilo fueron los primeros fumigantes usados como nematicida. Estos son generalmente líquidos, altamente volátiles y fitotóxicos. Se aplican al suelo a una profundidad de 15 a 20 cm aproximadamente antes de sembrar. A menudo, los productos de fumigación del suelo tienen uno o más de los siguientes ingredientes activos: cloropicrina, metam sodio, metam potasio, bromuro de metilo, 1,3-dicloropropeno y dazomet. Se usan para eliminar agentes causales de enfermedad que se encuentran en el suelo y que pueden provocar un daño significativo a los cultivos.

Los fumigantes de suelo son pesticidas de uso restringido. Esto significa que solo pueden comprarlos y aplicarlos los aplicadores autorizados del estado donde se aplicará el producto o aquellas personas bajo su supervisión directa. El aplicador autorizado que supervisa la aplicación también debe recibir capacitación específica en relación con el uso de los fumigantes de suelo.

TABLA 7. Químicos alternativos utilizados como fumigantes en suelos agrícolas (FAO, 2013).

FUMIGANTES	APLICACIÓN
Metam sodio	Isotiocianato de metilo (MITC) - Fumigante pre-plantación Directamente o a través del sistema de irrigación. Temperatura de suelo: 15 y 30 °C. Dosis: 100 ml / m ² (con formulados al 32.7 %).
	Dezomet - Granulado para el tratamiento de suelo preplantación. Dosis: 80-100 g / m ² (con formulaciones al 99%).
<i>1-3dicloropropeno (1,3-D).</i>	-Fumigante de pre-plantación que se evapora y difunde rápidamente como gas en el suelo, se inyecta. Dosis: 12 - 20 ml /m ² (con formulaciones al 97%).

3.3 Control cultural.

3.3.1 Rotación de cultivos.

La rotación de cultivos es el método más efectivo y más usado, la ausencia de un hospedante apropiado permite la reducción del número de plagas y reduce el inóculo de los patógenos, pero raramente elimina la plaga o el agente causal de la enfermedad. Muchas rotaciones incluyen el barbecho, el cual consiste en dejar la tierra temporalmente sin producción para reducir los patógenos del suelo y otras plagas eliminando hospedantes o sustratos para su desarrollo, y exponiéndolos a condiciones ambientales adversas. Para mayor efectividad se deben sembrar plantas resistentes o no hospederas del cultivo principal y plantas susceptibles en secuencia por un periodo de 3 a 4 años (FAO, 2013). En ocasiones es necesario variar los cultivos durante más de una campaña. Los nematodos formadores de quistes todos, al no encontrar hospederos adecuados, forman quistes, que protegen a los huevos y al segundo estadio J2 que está en dormancia dentro del huevo.

3.3.2 Abonos orgánicos.

Los abonos orgánicos reducen las poblaciones de nematodos fitoparásitos por que aumentan las poblaciones de enemigos naturales y producen algunos ácidos orgánicos nocivos a los nematodos. La adición de materiales al suelo reduce o suprime algunos de los patógenos del suelo mediante la estimulación de los microorganismos antagonistas, brindando nutrientes extras, alterando el pH, u otros varios efectos ambientales como el incremento de la microflora y microfauna del suelo. Las enmiendas orgánicas tales como la composta de diferente origen (subproductos de la agricultura, del área forestal e industrias de alimentos, etc.) estiércol,

enmiendas orgánicas y residuos de cultivos, todos pueden tener el efecto de controlar los patógenos del suelo y pueden ser fácilmente aplicados en los sectores de plantas ornamentales y hortalizas (FAO, 2013).

3.3.3 Solarización.

Bello, *et al.* (2010) probaron la alta eficacia del calentamiento solar (solarización), técnica de desinfección del suelo humedecido, con fertilización de base y cubierto con un película plástica transparente y expuesto a la luz del sol durante los meses con más altas radiaciones. Durante la solarización la temperatura del suelo llegan a ser letales para muchos organismos fitopatógenos y malezas, además de provocar complejas alteraciones en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, lo que redundará en ganancia de crecimiento y rendimiento de los cultivos. Esta práctica presenta efectos directos: como el hidrotérmico, la dosis letal de calor está en función de la temperatura del aire y del tiempo de incidencia solar, en los meses de mayor radiación solar las temperaturas en suelos solarizados pueden alcanzar de 35 a 60°C dependiendo de la profundidad que llega hacer hasta 30-50 cm de profundidad; los efectos indirectos se refieren la consecuencia en el aumento de temperatura, que se inducen en el suelo como las alteraciones microbiológicas que contribuyen al control de los patógenos. La reducción en la densidad y en el potencial de inóculo, así como la reducción de la habilidad competitiva saprofítica de los patógenos en los suelos solarizados, se debe a factores tales como: anulación de fungistasis; parasitismo o lisis por antagonistas estimulados por las altas temperaturas; muerte de patógenos debilitados causada por organismos termo tolerantes; antibiosis y competición, además de que el suelo puede adquirir la condición de supresividad previniendo, así, la reinfestación (Gepp *et al.*, 2002).

La actividad microbiana contra los patógenos del suelo, puede debilitar el inoculo durante la solarización, o suprimir su re-establecimiento después del tratamiento del suelo. Esto ha probado ser efectivo para diferentes hongos del suelo (*Verticillium* spp. *Rhizoctonia solani*, *Phytium* spp., etc.), nematodos y muchas malezas. El control de *Phytium ultimum* y *Sclerotium rolfsii* en el suelo expuesto a solarización ha sido exitoso, sin embargo, debido a que los nematodos son más tolerantes a el calor y su control es menos a efectivo a profundidades del suelo mayores a 30cm, esta técnica se ha combinado con la aplicación de nematicidas y otras estrategias también de tipo cultural e incluso biológico (Ramírez, 1996 citado por Perez Rodriguez, 2008). Otra limitacion

de esta técnica, es el cambio físico químico del suelo, se notan incrementos en la concentración de ciertos nutrientes minerales solubles, provenientes de la muerte y degradación de parte de los microbios residentes que los liberan al suelo. Entre ellos estaría el $\text{NH}_4\text{-N}$ que se acumula debido a la disminución de *Nitrobacter* y *Nitrossomonas* spp. en suelos solarizados con alto contenido de materia orgánica. También se citan incrementos para fósforo, potasio, calcio y magnesio (Cassanelo, *et al.*, 1999).

3.3.4 Biofumigación.

Entre las enmiendas orgánicas, se considera a la gallinaza y la incorporación de residuos de crucíferas. La familia de las Brassicáceas es fuente principal de isotiocianatos, material para la biofumigación. Plantas como el brócoli (*Brassica oleracea-italica*), col (*Brassica oleracea-capitata*) y mostaza (*Sinapis nigra*) producen compuestos químicos que son tóxicos para patógenos del suelo como nematodos, bacterias y hongos (Bello *et al.*, 2001). Las Brassicáceas contienen metabolitos secundarios llamados glucosinolatos, que al hidrolizarse por acción de la enzima mirosinasa dan lugar a los isotiocianatos. Estos productos de la hidrólisis, son biocidas muy eficaces contra nematodos, bacterias, hongos, insectos y germinación de semillas (Brown y Morra, 1997). Los isotiocianatos son compuestos muy similares a ciertos fumigantes, como el metil isotiocianato que es el compuesto activo del Metam Sodio. Este último producto empleado como nematicida tiene un amplio espectro de actividad al cambiar las propiedades físicas y químicas de suelo, también favorece el desarrollo del cultivo (Bello, *et al.*, 2000). La adición de materia orgánica con alto contenido de nitrógeno aminado produce un aumento de las actividades proteolíticas del suelo y en la liberación de NH_3 , teniendo el amoníaco un efecto nematicida (Flores-Camacho, 2003).

La acción de los microorganismos sobre la materia orgánica durante su descomposición produce gran cantidad de productos químicos que pueden actuar en el control de los patógenos del suelo. El amonio, nitratos, ácido sulfhídrico y un gran número de sustancias volátiles y ácidos orgánicos pueden producir una acción nematicida directa o afectar a la eclosión de los huevos o la movilidad de los juveniles de nematodos; los fenoles y los taninos son también nematicidas que a ciertas cantidades tienen efecto nematicida, por ello es difícil determinar con exactitud qué sustancia es responsable de la muerte de los nematodos. Se ha demostrado que durante el proceso

de descomposición de la col (*Brassica oleracea* L.) se liberan compuestos volátiles ricos en azufre y glucosalinatos (isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos, y oxazolidin-2-tionas) con propiedades nematocidas, cuyas concentraciones que dependen de los cultivos de Brassicaceae y sus etapas de desarrollo (Franco-Navarro, 2002; Zavaleta-Mejia & R.M., 1998; Barres, *et al.*, 2006; Bello, *et al.*, 2010). Se sabe también, que la incorporación de residuos de col, una semana antes o simultáneamente al trasplante de jitomate, reduce el número de agallas causadas por *N. aberrans* y favorecen el crecimiento y rendimiento de la planta, pero si se realiza el trasplante a pocos días de terminar el proceso de Biofumigación las plantas mueren por fitotoxicidad (Franco-Navarro, 2002).

En el pasado la utilización de estas prácticas podía considerárseles redituables, pero al paso del tiempo y la demanda del uso de residuos orgánicos, logro la elevación de sus costos. Es de suma importancia reducir los gastos de energía en el transporte, considerando aquellas alternativas que constituyan recursos locales (Bello, *et al.*, 2010).

La Biofumigación propicia la selección de la actividad microbiana, favoreciendo a los antagonistas, abriendo una oportunidad al manejo biológico. Esto se fundamenta en el uso de organismos tales como hongos, actinomicetos, otros nematodos o microartrópodos que reducen las poblaciones de nematodos.. Los mecanismos de acción son múltiples e incluyen la antibiosis a través de metabolitos, específicos o no, de origen microbiano, parasitismo, predación y competencia. En condiciones de equilibrio, el control biológico de nematodos se produce de manera natural. En situaciones en las que tal equilibrio está alterado, el objetivo de las técnicas de control biológico, es modificar tales condiciones, hasta conseguir que los nematodos no sean un problema para el cultivo (Barres, *et al.*, 2006).

3.4 Control Biológico.

Consiste en suprimir una plaga con enemigos naturales tales como depredadores y parásitos. En muchos ensayos se ha usado materia orgánica donde se reproducen los enemigos naturales, algunos de estos enemigos son nematodos depredadores, tardígrados, insectos y otros. Entre los parásitos se encuentra algunos protozoarios, virus, bacterias y hongos (Villacide y Corley, 2012).

El control biológico es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos o sus productos para controlar las poblaciones de otro organismo para que no llegue al nivel de plaga. Es un método agrícola que usa depredadores, parásitos, herbívoros u otros medios naturales. Puede ser un componente importante del Control Integrado de Plagas (también conocido como Manejo Integrado de Plagas, MIP), planteamiento más complejo del control de plagas, y es de gran importancia económica para la agricultura y para el medio ambiente. Consiste en aumentar artificialmente la población de enemigos naturales con objeto de producir una mayor tasa de ataque y con ello una disminución de la población del agente productor de daños. Esta estrategia tiende a ser utilizada en situaciones donde el control natural está ausente o se encuentra a niveles demasiado bajo para ser efectivo (Armendariz, *et al.*, 2015)

Los microorganismos que existen en la rizosfera proporcionan la primera línea de defensa para las raíces contra el ataque de patógenos y son ideales para su uso como agentes de control biológico, este también se puede utilizar idealmente con otros métodos de control, tales como la solarización del suelo, resistencia genética de plantas y la baja tasa de aplicación de nematicidas (especialmente organofosforados y carbamatos) para lograr un control significativo de los nematodos. En algunos casos el uso de enmiendas orgánicas con hongos también se ha recomendado para lograr un mejor control (Zaki & Mahmood, 1996; Weller, 1988).

3.4.1 Hongos implicados en el control biológico.

De los microorganismos que parasitan a los nematodos, los hongos tienen una posición importante y algunos de ellos han mostrado un gran potencial como agentes de control biológico, estos pueden aportar hasta el 80% del total de la biomasa microbiana en muchos suelos juegan un papel importante en el reciclaje del carbono, nitrógeno y otros elementos importantes de la biomasa (Zaki & Mahmood, 1996). Como organismos descomponedores, cabe mencionar que los hongos son responsables de la degradación de xenobióticos y contaminantes orgánicos introducidos en el suelo (Bordjiba, *et al.*, 2001; Barret, *et al.*, 2003). Los hongos también constituyen una parte importante de la cadena alimenticia dentro del suelo, especialmente en el caso de la mesofauna (Bonkowski, *et al.*, 2000). El mantenimiento de la diversidad de hongos del suelo debería, por ende, beneficiar directamente la agricultura sustentable, mediante el

suministro de nutrientes, una mejor estructura física del suelo y el control de antagonistas de los patógenos de las plantas en el suelo.

Unos 70 géneros y 160 especies de hongos se han encontrado asociados con nematodos, pero sólo unos pocos de ellos son agentes exitosos de biocontrol (Zaki & Mahmood, 1996). Algunos de estos hongos son: *Pochonia chlamydosporia*, *Monacrosporium*, *Catenaria spp*, *Drechmeria coniospora*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus spp*, *Fusarium solani*, *Cylindrocarpon cylindroides*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium lecanii*, *Arthrobotrys conoides*, *A. musiformis*, *A. robusta*, *Monoacrosporium elliposporum*, *Dactylaria thaumasia*, *Cylindrocarpon sp.*, *Trichoderma harzianum*, *Dactylella brochophaga*, *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys botryospora* y *Myrothecium verrucaria* (Piedra Naranjo, 2008).

TABLA 8. Tipos de hongos antagonistas de nematodos (Zaki & Mahmood, 1996; Lopez-LLorca & Hans-Borje, 2001)

TIPO DE HONGO	CARACTERISTICAS	GENEROS	IMPORTANCIA EN EL CONTROL BIOLÓGICO.
Endoparasitos	-A menudo parásitos obligados y tienen una fase saprofita limitado. Producen poco micelio en el suelo y completan su ciclo de vida dentro del cuerpo de sus anfitriones.	- <i>Catenaria spp.</i> : Zoosporas móviles que se enquistan sobre el nematodo, adhiriéndose a él y penetrando la cutícula. - <i>Drechmeria coniospora</i> : conidios adhesivos - <i>Harposporium spp</i> : conidios que son ingeridos. - <i>Pleurotus spp.</i> : productores de toxinas. tras ponerse en contacto con la toxina, el nematodo es rápidamente inmovilizado y las hifas del hongo crecen químicamente (dirigidas) a través de la boca del nematodo	Positivo. -Habilidad para crecer en la rizosfera. Negativo. Dependen del agua libre para su actividad, lo que limita la eficacia de estos hongos en el control biológico. - Los intentos de producirlos en grandes cantidades para la introducción en el suelo pueden no ser exitosa debido a su crecimiento limitado en cultivo.
Depredadores.	-Actividad fúngica máxima se alcanza sólo 12-15 días después de la introducción. - Se cree que la actividad de estos organismos puede ser estimulada por la adición de materia orgánica al suelo. - Forman diferentes tipos de trampas, como ramas adhesivas, trampas adhesivas de red, perillas adhesivas, los anillos no constricción y anillos de constricción, para capturar los nematodos. -Adhesivos y Mecánicos. Penetra la cutícula del nematodo y forma el bulbo de infección dentro del nematodo, a partir del cual las hifas	- <i>Arthrobotrys sp.</i> - <i>Monacrosporium</i> .	Positivo. - consiguen desarrollarse bien, aunque el sustrato sea pobre en nutrientes, humedad o con escasa densidad de nematodos. Negativo - Tienen una incapacidad para competir en un amplio rango de condiciones del suelo y son sensibles a los cambios en el medio ambiente.

	tróficas crecen dentro del cuerpo y digieren sus contenidos.		
Oportunistas.	<ul style="list-style-type: none"> - En contacto con quistes o masas de huevos, estos hongos crecen rápidamente y, finalmente, parasitan todos los huevos que se encuentran en etapas de desarrollo de embriones tempranos. -Compiten por los sitios de infección. -Alteran los exudados radicales y acumulan fitoalexinas. 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Purpureocillium (Paecilomyces) lilacinus</i> -<i>Pochonia chlamydosporia</i> 	<p>Positivo</p> <ul style="list-style-type: none"> -No dependen de una fuente de energía. - Atacan a los nematodos en diferentes etapas de su ciclo de vida. - libres de riesgos para la salud (excepto: <i>P. lilacinus</i> que causa toxicidad a mamíferos) <p>Negativo.</p> <ul style="list-style-type: none"> -Son afectados por factores ambientales. - Se requieren varias toneladas de inóculo fúngico para aplicación en el campo.

3.4.1.1 *Pochonia chlamydosporia* como parásito de *N. aberrans*.

P.chlamydosporia tiene una distribución mundial y se ha encontrado en los suelos supresores de nematodos parasitando los huevos. El hongo puede permanecer saprófitamente en el suelo en ausencia de ambos hospederos, plantas y nematodos, ha demostrado ser capaz de prevenir la eclosión de huevos de *M. arenaria* y colonizar los huevos por la penetración de las hifas. Tanto el corion del huevo y los juveniles resultaron ser afectados fisiológicamente, y las hifas fúngicas proliferaron rápida endógenamente en huevos y juveniles (Morgan & Rodriguez, 1985). El principal tipo de actividad destructiva, se piensa que es la interrupción enzimática y trastornos fisiológicos provocados por la biosíntesis de metabolitos tóxicos difusibles, se ha indicado que este hongo secreta varias proteasas. Que hidrolizan las proteínas de la capa externa del corion del huevo de *M. incognita*. En la rizosfera, el hongo puede colonizar las raíces de plantas huésped, se ha reportado que varias especies de *Pochonia* muestran un comportamiento de hábito de crecimiento endófito en algunas especies de Poacea y Solanaceae, que puede resultar en beneficios para la defensa de la planta huésped contra patógenos del suelo (Zaki & Mahmood, 1996; Manzanilla-Lopez, et al., 2013).

Varios factores han favorecido el uso de este hongo para el control biológico de nematodos, como son generalmente su fácil propagación, la obtención de nuevos aislamientos a partir de suelo y raíces, así como la eficacia en el control de nematodos. Debido al interés en el uso de medidas alternativas de control y la eliminación gradual del bromuro de metilo y de los

nematicidas para el control de nematodos, ha propiciado el desarrollo de agentes para el control biológico de nematodos , destacando el uso del hongo *Pochonia spp.*, contra las principales plagas de nematodos endoparásitos, *Meloidogyne spp.* y *N. aberrans*. (Manzanilla-Lopez, et al., 2013). Atkins et al. (2003) mencionan que el hongo tiene potencial como agente de control biológico contra agalladores de raíz (*Meloidogyne spp.*) y formadores de quistes de nematodos *Globodera spp.*, y *Heterodera spp.*

Kerry, 2001, menciona tres características importantes relacionadas con las propiedades de los aislados de *P. chlamydosporia* para considerarlos como agente de control biológico (BCA).. Estas incluyen su capacidad para (i) colonizar la rizosfera de plantas y cultivares; (ii) para producir clamidosporas in vitro; y (iii) para infectar huevos de nematodos (es decir, porcentaje de parasitismo).

Este hongo forma redes de hifas con órganos especializados del micelio que entran en contacto con el corion de los huevos para realizar la penetración (Irving & Kerry, 1986). *P. chlamydosporia* necesita suelos aireados y disponibilidad de nutrientes, por lo cual en suelos pobres deben agregarse nutrientes o aumentarse el nivel de inóculo, presenta también variaciones en cuanto a virulencia, habilidad para colonizar la rizosfera, crecimiento e incremento masivo in vitro entre aislamientos. Por lo que Bello, *et al.*, (2010), señalan que para que este hongo sea efectivo como agente de control, será determinante la cantidad de inóculo en la rizosfera, así como el tamaño de los nódulos en los que se desarrollan las hembras del nematodo, así como la tasa de desarrollo de los huevos en las masas.

3.4.2 Nematicidas orgánicos.

3.4.2.1 Utilización de la quitina y quitosano con efecto nematicida.

La quitina y sus derivados son efectivos en el control de enfermedades y plagas vegetales. Sus mecanismos de acción están vinculados a su estructura química. Pueden actuar sobre el organismo patógeno, o inducir mecanismos defensivos en las plantas, contra varias enfermedades vegetales antes y después de la cosecha (Velasquez, 2008). La adición de quitina y sus derivados al suelo, favorece el crecimiento y la actividad de muchos organismos quitinolíticos, por un efecto sinérgico. Estos constituyen controles biológicos y enemigos

naturales de muchos agentes causales de enfermedades y plagas vegetales. Además, favorecen el crecimiento y desarrollo de microorganismos beneficiosos que establecen relaciones simbióticas con las plantas, tales como las micorrizas o especies del género *Rhizobium*. A su vez, incrementan la población y la actividad microbiana en el suelo, lo que mejora la disposición de nutrientes y sus propiedades. Como reguladores del crecimiento, aceleran la germinación de las semillas, el vigor de las plantas, y el rendimiento agrícola. Por tanto, por su gran potencial de aplicación en la agricultura, se augura que se utilizarán con una mayor extensión, principalmente como sustitutos de los actuales plaguicidas químicos o como reguladores del crecimiento de las plantas (Ramírez, *et al.*, 2010).

El quitosano inhibe el crecimiento de especies de hongos, la actividad fungicida del quitosano se ha asociado desde hace mucho a su carácter catiónico (Hernández, 2004). La interacción de los grupos amino libres, cargados positivamente en medio ácido, con los residuos negativos de las macromoléculas expuestas en la pared de los hongos, cambian la permeabilidad de la membrana plasmática, con la consecuente alteración de sus principales funciones, exceptuando, o siendo menos efectivo con aquellas que lo poseen en sus paredes celulares, como cabría esperar, los hongos que poseen quitosano como componente de sus paredes celulares deberían ser menos sensibles a la aplicación de dosis razonables de éste por dos razones: (a) la presencia natural de quitosano en las paredes celulares no genera efectos adversos para el microorganismo y (b) las interacciones electrostáticas del quitosano añadido (exógeno), cargado positivamente, deberían verse menos favorecidas con paredes celulares que poseen quitosano endógeno que cuando éstas poseen material con cargas negativas (Velasquez, 2008).

La quitina es un componente estructural rígido y resistente que contribuye a la resistencia mecánica de los organismos que contienen quitina. Es el polisacárido más abundante en la naturaleza (después de la celulosa), y uno de los biopolímeros que genera gran interés debido a sus propiedades físico-químicas y biológicas, así como por sus potenciales aplicaciones. Es el componente principal del exoesqueleto de la mayoría de los invertebrados: artrópodos, insectos y crustáceos, además de las paredes celulares de los hongos, algas, y el corión del huevo de los nematodos, estructuras quitinosas que muestran una concentración de quitina variable, que excepcionalmente constituye más de la mitad de la materia orgánica total. (Ravi Kumar, 2000; Synowiecki, 2003; Cohen, 2001; Tharanathan, 2003).

La degradación enzimática de la quitina se realiza por un sistema quitinolítico con acción sinérgica y consecutiva. Diversos organismos (que contienen o no quitina producen una gran variedad de enzimas quitinolíticas con diferentes especificidades y propiedades catalíticas, con funciones fisiológicas que implican la nutrición, el parasitismo, el reciclaje de quitina, la morfogénesis, y/o defensa. El interés en las enzimas quitinolíticas dentro del campo del control biológico ha surgido debido a su posible participación en la actividad antagonista frente a organismos patógenos que contiene quitina, un ejemplo claro de ello son los hongos, estos presentan características adecuadas como agentes potenciales de control biológico de insectos, hongos y nematodos, debido a la producción de enzimas con acción antagonista (Gortari & Hours, 2008).

El huevo de nematodos es un elemento estructural conformado por quitina, a pesar de ser una de las estructuras biológicas más resistentes, los huevos son susceptibles de ser atacados por los hongos nematófagos, debido a la producción de las quitinasas, en la ruptura de la cáscara del huevo; se ha reportado resultados significativos, en donde esta aumenta la actividad de los hongos nematófagos que parasitan huevos, nematodos agalladores y formadores de quistes; por ello el uso de quitina con hongos nematófagos ha sido recomendado para el control de nematodos (Rodríguez-Kabana, *et al.*, 1984; Castro, *et al.*, 2011; Gortari & Hours, 2008).

CAPITULO II

Pochonia clamydosporia como agente de control biológico.

INTRODUCCIÓN

El control biológico se convierte en una alternativa ambientalmente segura para reducir el uso de nematicidas químicos en el Manejo Integrado de Plagas, dentro del cual se han evaluado varios agentes de control biológicos tales como: *Purpureocillium lilacinus* (Thom) Samson, *Trichoderma spp.*, *Arthrobotrys spp.*, las bacterias *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr, *Tsukamurella paurometabola*, *Steinhaus* cepa C-924 y *Bacillus thuringiensis* Berliner cepa LBT-24 entre otros, los cuales han logrado disminuir las infestaciones de *Meloidogyne spp.* y algunos utilizados para *N.aberrans* en cultivos susceptibles. No obstante, no existe ningún producto comercial ampliamente utilizado (Rodríguez, 2007). *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams, es un hongo parásito facultativo de huevos de nematodos, el cual ha mostrado tener potencial como agente de control biológico de nematodos especies formadores de agallas (*Meloidogyne spp.* y *N.aberrans*), en sistemas de cultivos intensivos de hortalizas (citas)

P. chlamydosporia se caracteriza por presentar colonias de rápido crecimiento (20-38mm de diámetro a los 10 días), de apariencia algodonosa y de color blanco que con el tiempo se torna de color crema. Su temperatura óptima de crecimiento oscila de los 24 a los 27°C. Los conidióforos son usualmente postrados y con hifas aéreas, algunas veces erectas, fiálides verticiladas o solitarias. Los conidios presentan forma subglobosa o elipsoidal, agrupándose en cabezuelas mucilaginosas. Producen estructuras de resistencia que son las clamidosporas sobre la superficie de la colonia (Domsh y Gams, 1980 y Zare *et al.* 2001). *P. chlamydosporia* parasita huevos de nematodos formadores de agallas mediante la formación de apresorios que se desarrollan a partir de la hifa diferenciada y que les permite la colonización de la superficie de los huevos de los nematodos (Morgan, *et al.*, 1985). En México se han encontrado algunos aislamientos nativos de *P. chlamydosporia* (*P. c. var. chlamydosporia*) parasitando a *N. aberrans*, procedentes del Estado de México, Tlaxcala, Zacatecas y Puebla, los cuales ofrecen la oportunidad de implementar una estrategia para el control del nematodo falso nodulador (Flores, 2003; Manzanilla –López *et al.*, 2013).

Para la producción masiva de este u otros organismos con potencial para ser usados como biocontroladores de plagas, tiene que tomarse en cuenta que las formulaciones a escala comercial deben ser manipulables y con propiedades que garanticen su viabilidad en almacén por períodos mayores a los 12 meses a temperaturas cercanas a los 25°C. Para algunos investigadores, las

formulaciones hechas a partir de micelio y biomasa conidial tienen como ventaja que pueden ser almacenadas durante períodos muy largos y aun así permanecer biológicamente activas (Stirling y Mankau, 1978). En México, este aspecto de generación de productos a base de *P. chlamydosporia* ha sido desatendido y por ello existe la necesidad de que se realicen estudios alrededor del proceso de producción masiva y de su efectividad como regulador de nematodos.

Trabajos realizados en la producción masiva de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* mencionan a utilización de sustratos como el arroz quebrado de Hidalgo et al. (2000), utilizando un método de fermentación bifásico, obteniendo un número de clamidosporas entre 0.3 y $5.5 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ de sustrato colonizado. En México, el primer reporte sobre pruebas de producción masiva de *P. chlamydosporia* fue el realizado por Flores (2003), quien probó trigo molido+arena de cuarzo como arroz (bajo un método de fermentación bifásico), como sustratos de crecimiento de diferentes aislamientos mexicanos. Sus pruebas mostraron que el número de clamidosporas fue mayor para el caso del trigo molido+arena de cuarzo (6.4 a 6.9×10^6) cuando se trató del arroz bajo el método bifásico de fermentación.

El método de producción masiva ha sido modificado con el fin de estandarizarlo y llevarlo a niveles de producción en mediana y gran escala para la aplicación del hongo en diferentes ambientes, tanto en invernadero (Pérez, 2004) como en campo. Es importante mencionar que hasta el momento sólo los aislamientos producidos masivamente en un sustrato sólido, son los que han resultado viables para ser aplicado en campo; por tal motivo, es importante buscar un método sencillo de producción del hongo, así como el mejor sustrato para su crecimiento (accesible, económico y de calidad), sin olvidar por supuesto que el producto resultante debe ser de buena calidad. Sin embargo no se ha podido lograrse la estandarización de este proceso, con una formulación adecuada que evite la contaminación.

Ante la necesidad de estudiar el potencial de los aislamientos mexicanos de *P. chlamydosporia*, y así determinar su posible incorporación al control integrado de *N. aberrans*, se llevó al cabo la presente investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1 . Detección de *P. chlamydosporia*.

Fueron tomadas dos muestras de suelo y raíces de jitomate en un predio naturalmente infestado por *N.aberrans* en la localidad de Coatlinchan, Texcoco, Edo. de México. Los cuales fueron llevados al laboratorio y conservadas en un cuarto frio, realizando técnicas de detección del hongo *Pochonia* a continuación descrita.

1.1 Detección a partir de raíces (Kerry, 1993, Hidalgo, 2000 modificado por Perez, 2004).

Se lavaron las raíces para eliminar el exceso de suelo y desinfestaron con hipoclorito de sodio a 0.5%, se cortaron en trozos de 1cm aproximadamente, se mezclaron perfectamente y se tomó una submuestra de 1g (fueron tomadas tres submuestras). En un mortero limpio y seco, esterilizado con alcohol, se adiciono el gramo de raíces y 9ml de Agar Agua (A-A) al 0.05%; la mezcla se macero y se tomó 1ml de esta solución para diluirlo en otro tubo con 9ml de Agar Agua (dilución 10^{-1}), este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución 10^{-4} . De esta dilución se tomaron 0.2ml y se vació en cajas de Petri con medio de cultivo Papa dextrosa agar (PDA), distribuyéndolos en el medio con un asa triangular de vidrio.

Estas cajas sembradas con la suspensión del macerado de raíces se incubaron durante 10-14 días a 27°C para luego identificar las colonias de *P. chlamydosporia*.

1.2 Detección a partir de suelo (Kerry, 1993; Hidalgo, 2000 modificado por Perez, 2004)

Se tomaron muestras de suelo de 100g aproximadamente, éstas se homogenizan y se pusieron a secar a temperatura ambiente. Posteriormente se tomaron tres submuestras de 1g, las cuales se procesaron; colocando cada gramo de suelo en un tubo de ensaye con 9ml de A-A al 0.05% (dilución 10^{-1}). Este procedimiento se repite hasta obtener una dilución 10^{-4} . De esta última dilución se tomaron 0.2ml que se estriaron en cajas Petri con medio de cultivo PDA + Amikasina (500mg/ L), distribuyéndolos en el medio con un asa triangular de vidrio. Incubando las cajas según la metodología anterior descrita.

1.3 Detección a partir de masas de huevos (Kerry, 1993; Hidalgo, 2000 modificado por Perez, 2004).

A partir de unas muestras compuestas de raíces con síntomas, se tomaron tres submuestras de 1g cada una. Se separaron las masas de huevecillos enteras (10 masas). Se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5%, posteriormente fueron sembradas en cajas Petri con medio PDA+ Amikasina (500mg/1L) e incubadas por espacio de 4 días a 27°C, periodo de tiempo después del cual se verifico la presencia del hongo.

2 . Identificación morfológica de *P. chlamydosporia*.

A partir del aislamiento purificados se tomaron muestras para un análisis microscópico, se utilizaron preparaciones temporales con lactofenol azul de algodón. Después, mediante la observación en el microscopio compuesto Zeinss© se identificó el tipo de micelio, conidios y disposición en los conidióforos, así como la presencia de estructuras de resistencia (clamidosporas), estructuras de resistencia y disposición de conidióforos. Para su identificación se utilizó la clave taxonómica de (Gamms, 1988; Gamms y Zare, 2001)

3 . Conservación de *P. chlamydosporia*.

Los aislamientos fueron conservados utilizando las metodologías que a continuación se describen.

1) Tubos de ensaye inclinados a con PDA y aceite mineral.

Esterilizar el aceite mineral 121/20min previamente en tubos herméticos. En un tubo de ensaye con PDA (10ml) previamente esterilizado se siembro el hongo y después de que el crecimiento micelial cubría la superficie, a este se le agrego aceite mineral 2ml, previamente esterilizado (121 libras de presión/20 min).

2) Tiras de papel filtro.

En cajas de Petri con medio de cultivo PDA se colocaron tres tiras de papel filtro simulando un triángulo en el centro se adiciono un disco de PDA de 5mm de diámetro con micelio en desarrollo. Las cajas fueron incubadas a 27°C durante 14 días. Las tiras de papel con crecimiento

fungoso fueron removidas con unas pinzas de disección y colocados dentro de tubos de ensaye de 25ml, los tubos fueron tapados con algodón y sellados con parafilm y se almacenaron a 5°C.

3) Frio a -80°C en glicerol al 10%.

Se preparó medio de PDA, se esterilizo y vacío en cajas Petri estériles, *P. chlamydosporia* se sembró e incubo a 27°C, después de 14 días de edad se tomaron discos de 0.5 cm y se colocaron en viales criogénicos con glicerol estéril al 10% y se preservaron a -80°C (Cárdenas, 2010.)

4 Propagación de *P. chlamydosporia* en medio bifásico.

El uso de hongos para el control de plagas agrícolas depende de diferentes factores, incluyendo la habilidad para producir altas concentraciones de propágulos estables a un costo plazo (Jaronski, 1986). El sistema de producción para algunos hongos usa el método bifásico en el cual el micelio o hifas son producidas en medio líquido, para después ser transferido a substrato sólido e incrementar la producción de conidios y clamidosporas (Guillon, 1997).

4.1 Fermentación líquida (Cruz-Martínez, 2007; Velasco, 2015).

Fue elaborado Caldo Sabouraud Dextrosa esterilizado a 121/20 min junto con un matraz kitasato, un manguera, matraz de 500ml y tapones de corcho, los cuales fueron utilizados para elaborar un fermentador. En el matraz kitasato se colocaron 500ml de Caldo Sabouraud Dextrosa, en el que fueron sembrados 6 discos de cultivo de *P. chlamydosporia* con 21 días de crecimiento en PDA. Este fue tapado perfectamente con un tapón de corcho y conectado por medio de una manguera a otro matraz (500ml) el cual también se encontraba perfectamente sellado, en su interior se colocó 70% de Alcohol al 96% y 30% de alcohol isopropilico. El cual se dejó en un agitador a 120rpm durante 5 días, procurando un desnivel entre ambos matraces donde el matraz kitasato con el cultivo del hongo tenga que tener mayor altura.

4.1.1 Determinación de la fase exponencial de crecimiento y formación de esporas en el medio líquido.

Se determinó el crecimiento y esporulación en la fase líquida utilizando tubos de ensaye (15ml) con Caldo Sabouraud Dextrosa (SDC) esterilizado a 12 lb/20min. En cada tubo de ensaye se introdujo un disco de PDA con crecimiento micelial de 21 días de *P. chlamydosporia* ($7 \times 10^6 \pm$

2.27 UFC/ml) los tubos se colocaron en un agitador orbital (110 rpm). Se determinó la curva de crecimiento mediante la toma de muestras de biomasa (esporas, fragmentos micelio, blastoesporas) cada 12 h, se realizó el conteo de conidios presentes en los tubos por un periodo de 8 días. La determinación de unidades infectivas se determinó mediante una cámara Neubauer bajo microscopio óptico.

4.2 Fermentación sólida (Hidalgo, 2000, modificado por (Perez, 2004)).

La inoculación consistió en la inyección de la bolsa con la suspensión del hongo en jeringas de 30ml en la bolsa.

4.2.1 Cultivo sólido bifásico, formación de clamidosporas por g^{-1} de sustrato.

Como sustrato se utilizó maíz quebrado. Se realizaron 5 lavados al sustrato con agua potable hasta que no se observara una apariencia lechosa en el escurrimiento del agua. El sustrato se escurrió y se secó a temperatura ambiente extendido en un cernidor y se removió periódicamente hasta obtener el punto de secado (20% de humedad aproximadamente). Una vez seco el sustrato se pesó (250 g) y se colocó en bolsas de poli papel con capacidad para medio kilo, cada bolsa se selló con cinta adhesiva blanca gruesa y todas se esterilizan a 121°C por espacio de 25 min. Las bolsas se dejaron enfriar durante 24hr con el fin de descartar contaminación y se inocularon con $3.8 \times 10^8 \pm 1.7$ UFC/ml (fragmentos de micelio y conidios).

Con la finalidad de obtener una reducción de contaminación en sustrato sólido, se buscó la utilización de conservadores o productos modificadores de pH contra bacterias anaeróbicas, un ejemplo de ellos es el Ac. Láctico y EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético), realizando la siguiente prueba. En la evaluación de crecimiento del hongo y reducción de contaminantes se utilizaron matraces de 250ml con sustrato de arroz o maíz (50g) utilizando la metodología antes descrita, después de 24h se les colocó 100 y 200 μ l de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y Ac. Láctico (1 molar), estos fueron inoculados con 6ml del hongo (182880 UFC/ml), teniendo 3 repeticiones más el testigo. Para realizar el conteo se pesó un gramo del sustrato colonizado, se vertió en un tubo de ensaye con 9ml de agua agar (AA), para obtener una dilución de 10^{-1} , a partir de esta y una vez agitada la suspensión se preparan diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} , en esta última, se toma alícuotas y se realizó en conteo con apoyo de una cámara Neubauer.

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

5.1 Obtención de masa de huevecillos de *N. aberrans*.

Manualmente se separaron masas de huevecillos con agujas de disección que se depositaron en cajas Petri (60 x 15 cm). Las masas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio NaClO al 0.53% dejándolas reposar durante 60 segundos, se enjuagaron inmediatamente con dos cambios de agua destilada estéril, la solución se pasó por tamices de 100 y 400 mallas para eliminar residuos de cloro y recuperar los huevos y se incubaron a 25°C durante 8 días (Flores-Camacho, 2003; Velasco, 2014).

5.2 Prueba de parasitismo de *P. chlamydosporia* sobre huevos de *N.aberrans* in vitro.

Con la obtención de masa de huevecillos esterilizados se colocaron en placas de agar-agua (1%) con Amikacina 500mg/1L. En cada placa se colocaron 200 huevecillos y se inocularon con 10µl de una suspensión de conidios ($6.35 \times 10^5 \pm 1.7$ UFC/ml). Las placas fueron incubadas a 28°C en completa oscuridad y la infección por los hongos fue evaluada diariamente por un periodo de cuatro días. Los huevos con desarrollo del hongo fueron considerados como infectados.

6 Pruebas de quitina (HYTC-concentrado en polvo) como agente de control biológico de huevos de *N. aberrans*.

En esta prueba se utilizó el producto comercial concentrado en polvo (HYTC BioQuitina®), en placas de cultivo estéril de 12 pozos (Corning New York®) se colocaron 200 huevecillos de *N. aberrans* en 100µl de agua destilada. A cada pozo se le coloco 1.5ml de quitina de una solución stock según lo citado por Sánchez, (2010); siguiendo la metodología antes mencionada, se utilizó una suspensión de 10µl de *P. chlamydosporia* para probar el efecto del hongo en contacto con la quitina. Se realizaron observaciones de 12, 24, 48, 72, 96, 108 y 132 hrs. Evaluando huevos sin degradación, con eclosión y huevos con degradación en el corión, sin eclosión.

RESULTADOS.

1.1 Identificación de *P. chlamydosporia*.

Se obtuvo un aislamiento nativo de *P. chlamydosporia* de la localidad de Coatlinchan, al Sur del Municipio de Texcoco, Estado de México, proveniente de masas de huevecillos de *N. aberrans*. A partir de la observación de preparaciones fijas con crecimiento provenientes de placas de Papa Agar (PA) bajo microscopio óptico, se diferenciaron estructuras de conidios solitarios ovoides con paredes delgadas y lisas (**Fig.5A**), dispuestos en conidióforos simples, micelio de color blanco con fiálides dispuestas por separado o en verticilos de dos a tres hifas postradas a los 5 días de crecimiento (**Fig.5C**) (Gamms, 1988; Nonaka, *et al.*, 2013).

Después de 10 días de incubación en placas con medio PDA (Papa Dextrosa Agar) a 26°C, se observó un crecimiento con apariencia algodonosa, con colonias de bordes redondeados de color blanco, que con el tiempo adquirió una tonalidad marrón crema y a su reverso una tonalidad amarilla, (**Fig. 5B**) (Gamms, 1988). Presenta un micelio delgado no septado verticilado (**Fig. 5E**). Después de 14 días de crecimiento en el medio de cultivo Papa Agar (PA) se observó una abundante cantidad de dictioclamidosporas de 20 a 25 µm de diámetro (**Fig.5 D y F**) con paredes gruesas, pecioladas además de micelio aéreo con fiálides en verticilos, indicando con este conjunto de características morfológicas, que se trata de *P.chlamydosporia*. var. *chlamydosporia* (**Fig.5**). (Bourne & Kerry, 2002).

Clave taxonómica de *Pochonia chlamydosporia* (Zare & Gamms ,2001).

Pochonia

Colonias con rápido crecimiento, alcanza un crecimiento de 15-40 mm de diámetro en 10 días. Conidióforos usualmente postrados y pequeñas diferencias de hifas vegetativas, a veces erectas.

Fiálides con células conidiogénas, verticiladas o solitarias. Los conidios subglobosos, en barra elipsoidal, isodiamétrica-poliédrica, o falcados con extremos romos, adheridas en cabezas globosas o cadenas. Dictioclamidosporas a menudo se producen a la superficie de la colonia o sumergidas en el agar. Cristales ausentes.

Clave para las especies de *Pochonia*.

1. Al menos de los conidios en forma de media luna o falcado.....*P.bulbillosa*
- Conidios no en forma de luna o falcados.2.

2. Conidios isodiamétricos-poliedricos; Dic clamidosporas presentes, usualmente en la superficie del agar.....*P. gonioides*
 Conidios en forma de varilla, lisa, con extremos truncados, 2.0-2.5x 0.8-1.0; dictiochlamydosporas escasas, sumergidos en el agar.....*P. microbactrospora*.
 Conidios de otras formas, oval, subglobosas a subcilindrica, liso, dictioclamidosporas encima, en o en el agar.....3
3. Dictioclamidosporas, al menos en los aislados frescos, abundantes, sobretodo en el micelio aéreo, conidióforos típicamente postrado.....4
 Dictioclamidosporas, si están presentes, principalmente sumergidas en el agar; Conidióforos postrados o erecto.....5
4. Conidios solamente en cabeza, nunca en cadena..... *P.chlamydosporia var. chlamydosporia*.
 Conidios en su mayor parte en cadenas; Algunas cabezas pueden estar presentes..... *P.chlamydosporia var. catenulata*..
5. Color de la colonia que revela sombras rojas en PDA; Conidióforos próstata, verticilado; chlamidosporas escasas o ausentes.....*P. rubescens*.
 Colonia reversa amarilla a crema (no roja) en PDA; Conidióforos parcialmente erectos, ricamente verticilados; dictioclamidosporas parcialmente sumergidas en el agar.....6
6. Conidios sólo en cabezas, nunca en cadenas.....*P.suchlasporia var. suchlasporia*.
 Conidios en su mayor parte en cadenas, algunas cabezas pueden estar presentes... *P.suchlasporia var. catenata*..

1.2 Determinación de la fase de crecimiento y formación de esporas.

Pudo observarse un crecimiento exponencial en la formación de esporas en medio liquido de 2.58×10^{10} UFC/ml \pm 4.5 al tercer día (**Figura.6, Tabla.8**), indicando que este fu el tiempo necesario para el óptimo crecimiento del hongo en fermentación liquida, al descartar la presencia de contaminantes se puede llevar a inocularse en medio sólido. En cultivos en recipientes cerrados una población no puede crecer indefinidamente de forma exponencial, las limitaciones de crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por combinación de las causas anteriores, por lo que la determinación de la fase de crecimiento estacionario de este hongo, es de gran apoyo para su propagación masiva en medio sólido.

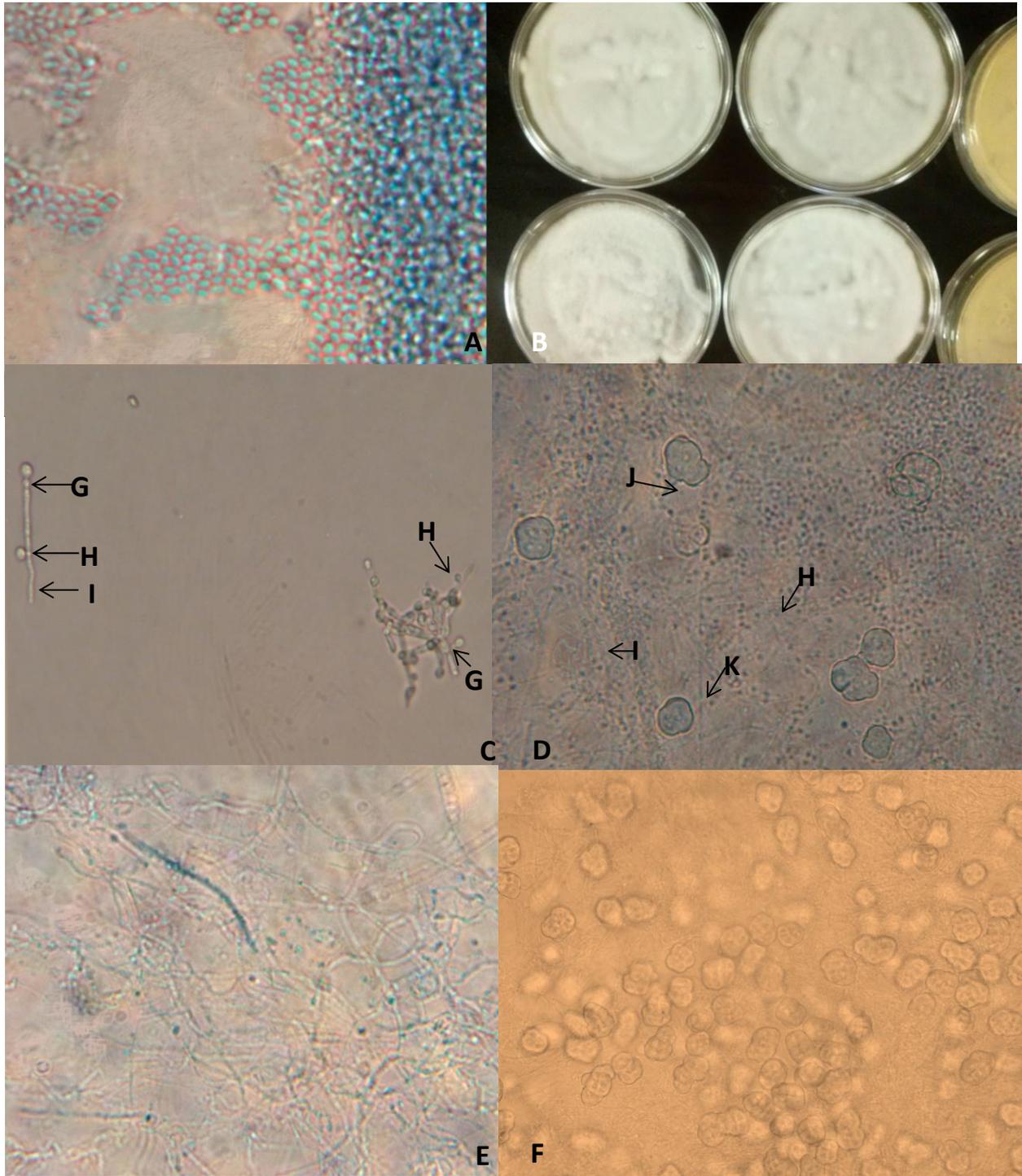


Fig.5. *P.chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. A) Conidios ovoides y masa conidial. (100x) B) Crecimiento esponjoso de color blanco con el tiempo adquiere una tonalidad marrón crema y a su reverso una tonalidad amarilla. C) Conidióforos con conidios solitarios sobre fiálides (100x). D y E) Clamidosporas pecioladas. F) Micelio verticilado. G.Fialide. H. Conidio. I. Micelio. J. Clamidospora peciolada. K. Clamidospora. (PA2) correspondiente a la localidad de Coatlinchan observados en un microscopio óptico (40x).

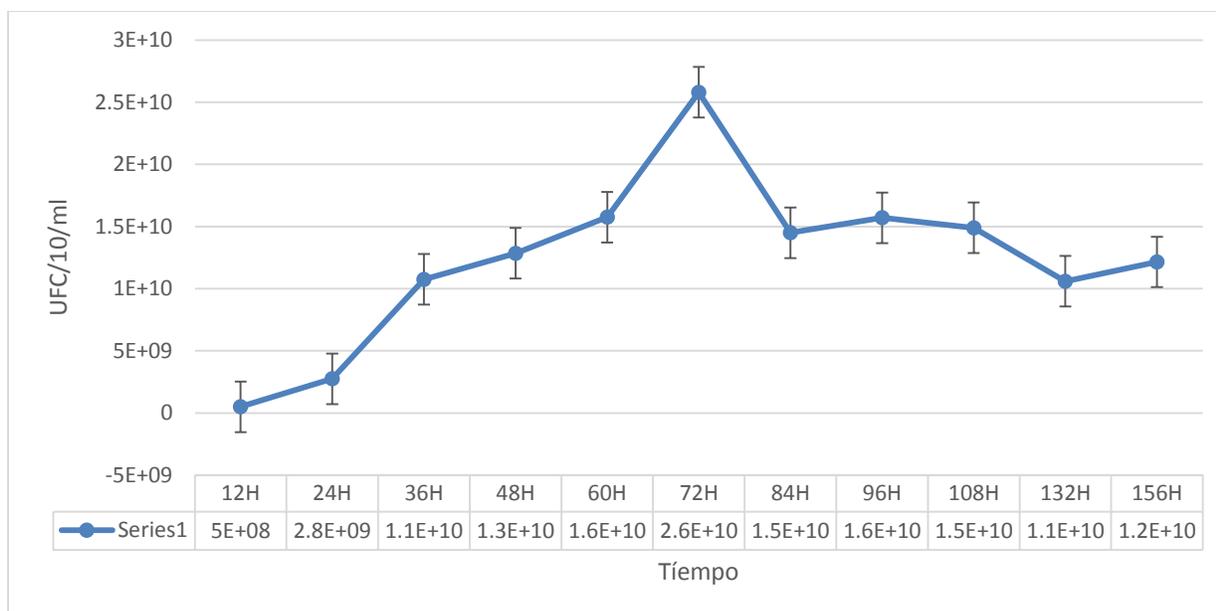


FIGURA. 6 . Determinación de la fase de crecimiento de *P. chlamydosporia* var *chlamydosporia*, donde se observó la fase exponencial de crecimiento al tercer día, seguida de una declinación de la curva por agotamiento de nutrientes en el cultivo.

TABLA 9. Determinación de la fase de crecimiento y formación de esporas de *P. chlamydosporia* var *chlamydosporia*.

	Tiempo											
	12H								24H			
Repeticiones	12 Hr	24H	36H	48H	60H	72H	84H	96H	108H	232H	256H	280H
1	0	4	9	16	36	26	33	41	28	17	23	25
2	0	3	10	18	26	34	43	23	22	29	17	27
3	0	3	7	25	21	49	69	34	41	40	21	20
4	0	1	4	30	21	20	49	40	34	26	25	23
5	0	4	6	13	32	28	43	21	27	33	12	19
1	0	3	4	26	23	27	67	31	22	32	17	22
2	0	1	3	25	22	32	49	18	24	39	17	37
3	0	3	5	22	24	37	53	24	60	30	26	35
4	0	3	3	20	21	21	54	38	23	22	30	18
5	0	4	4	20	31	41	56	20	33	30	24	17
MEDIA	0	2.9	5.5	21.5	25.7	31.5	51.6	29	31.4	29.8	21.2	24.3
UFC/mL	0	145000 000	275000 000	107500 0000	128500 0000	157500 0000	258000 0000	145000 0000	157000 0000	149000 0000	106000 0000	121500 0000
10ml	0	145000 0000	275000 0000	1.075E+ 10	1.285E+ 10	1.575E+ 10	2.58E+1 0	1.45E+1 0	1.57E+1 0	1.49E+1 0	1.06E+1 0	1.215E+ 10

1.3 Reproducción masiva de *P. chlamydosporia*.

Las bolsas con maíz como sustrato solido después de 21 días de incubación a una temperatura constante de 26°C, se observó la completa colonización del sustrato por *P. chlamydosporia*, obteniéndose una concentración de $1.7 \times 10^9 \pm 1.16 \text{ UFC} \pm/\text{ml}$ en 200g de maíz quebrado.

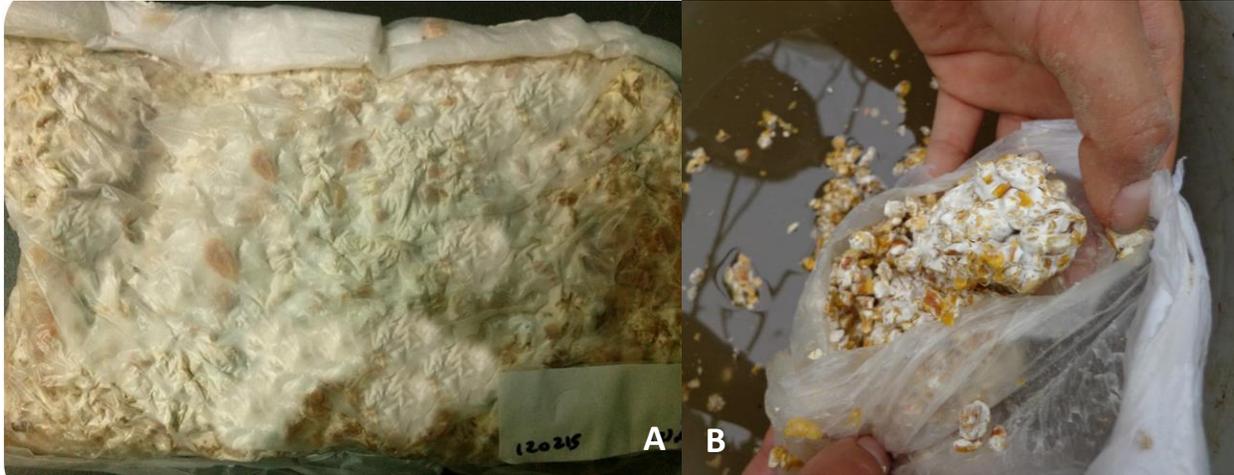


FIGURA. 7 Crecimiento de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en medio sólido de maíz quebrado. A) Bolsa de 200gr. Completamente colonizado. B) granos de maíz colonizado.

1.4 Parasitismo de huevos.

El aislamiento proveniente de masa de huevecillos de la localidad de Coatlinchan, Texcoco, Edo. México, parasito el 86% de los 200 huevos previamente desinfectados que se depositaron en placas con crecimiento de *P. chlamydosporia*, observando su parasitismo desde las 12hrs de siembra. Los conidios al germinar envolvieron los huevos (**Fig.8.A**), después de 24 hrs, se observó una colonización completa en el huevo parasitado y la degradación del corion, como también el crecimiento endógeno del hongo (**Fig.8D**).

Es importante tener en cuenta que *P. chlamydosporia* no reduce la invasión de los juveniles en la planta, que el objetivo principal es reducir las masas de huevos (Manzanilla-Lopez, et al., 2013). *P. chlamydosporia* parasita huevos de nematodos formadores de agallas, mediante la formación de apresorios que se desarrollan a partir de hifas indiferenciadas y que les permite la colonización de la superficie de los huevos de los nematodos (**Fig.8**), posteriormente, la penetración de los huevos se debe a la presión física y la actividad enzimática por parte del hongo mediante la proteasa serina-alcalina-subtilasa denominada VCP1, capaz de remover la membrana vitelina más externa del corion al hidrolizar las proteínas *in situ* a partir de la capa externa del corión del huevo (**Fig.8E**) y exponer la capa de quitina (Morgan & Rodriguez, 1985; Tikhnov, et al., 2002).

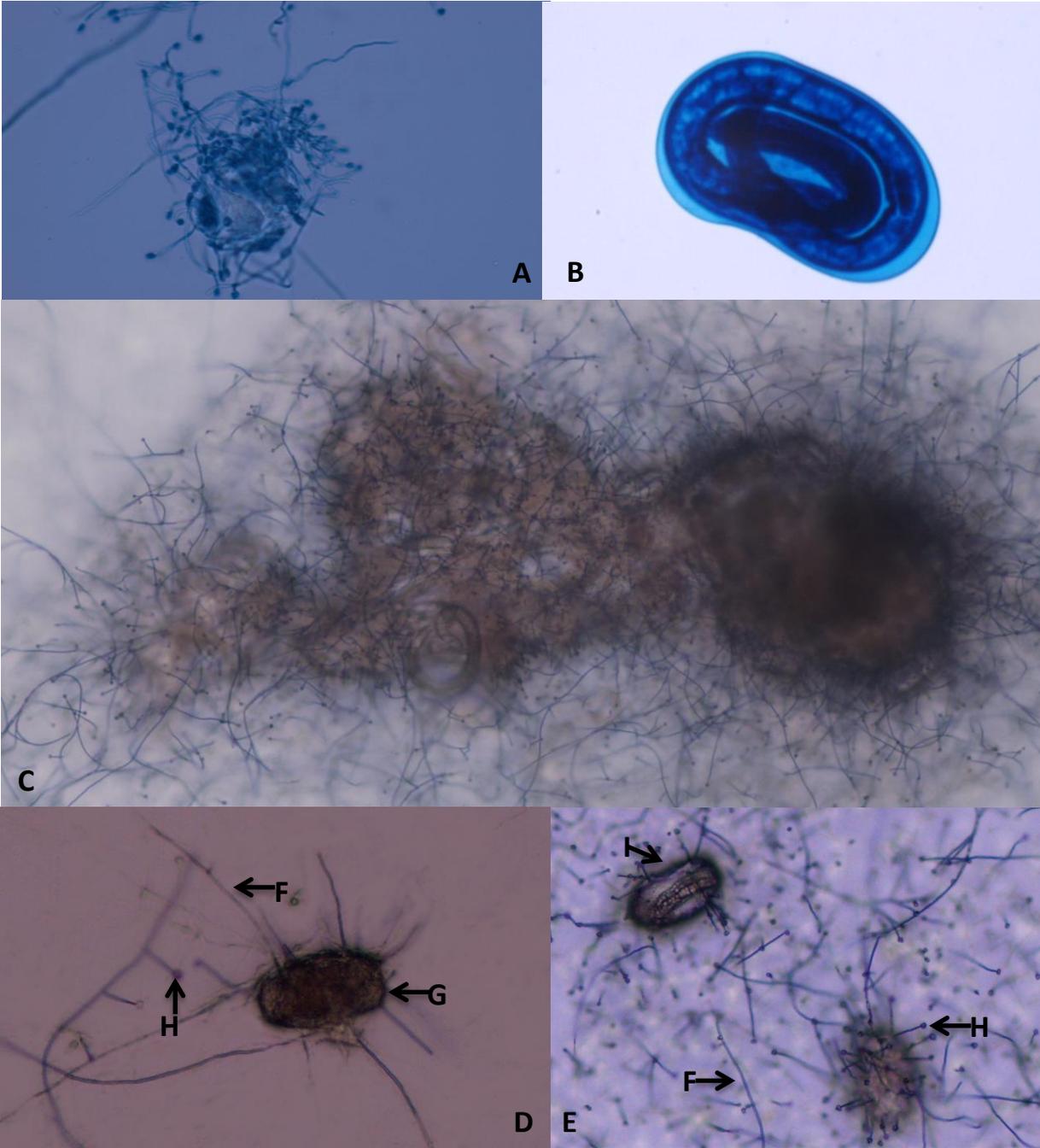


FIGURA. 8. Parasitismo de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en huevecillos de *N. aberrans*. A) Huevos rodeados por conidios germinados. (100x) B) Huevos sin parasitar de la prueba control. (100x) C) Masa de huevos colonizado por micelio verticilado. (100x). D y E) Huevo parasitado por micelio. F. micelio. G. huevecillo de *N. aberrans*. H. conidio.

1.5 Reproducción de *P. chlamydosporia* en medio bifásico con EDTA y ac. Láctico.

Pudo observarse crecimiento micelial del hongo al tercer día de inoculación, y presencia de clamidosporas al octavo día. No existió diferencia significativa en cuanto a la producción de unidades formadoras de colonia (UFC), entre los sustratos de maíz y arroz con EDTA y ac. láctico (100 y 200µl), sin embargo no se observó contaminación después de los 30 días en los matraces con EDTA y ac. láctico a diferencia de los testigos, además de poder observarse una mayor producción de UFC en el sustrato de maíz con EDTA (100 µl) con 1.8×10^9 UFC g⁻¹ y Arroz con ac. láctico (200 µl) con 1.76×10^9 UFC g⁻¹, seguido de maíz con EDTA (200 µl) con 15.3×10^9 UFC g⁻¹ y maíz con ac. láctico con 12×10^9 UFC g⁻¹, siendo los testigos los que produjeron menor número de UFC con 3.9×10^8 UFC g⁻¹ para el sustrato con arroz y 9.4×10^7 UFC g⁻¹ en maíz con ac. láctico con 9.4×10^7 UFC g⁻¹.

TABLA 10 Producción de UFC de *P. chlamydosporia* var *chlamydosporia* en sustrato sólido a base de maíz y arroz con EDTA y Ac. Láctico en dos concentraciones (100 y 200 µl)

SUSTRATO	CLAVE	UFC g ⁻¹
Testigo arroz	TA	390000000
EDTA 100 µl	EDTA1A	387000000
EDTA 200 µl	EDTA2A	270000000
Ac. Láctico 100 µl	LAC1A	870000000
Ac. Láctico 200 µl	LAC2A	1763333333
Testigo maíz	TM	188910000
EDTA 100 µl	EDTA1M	1830000000
EDTA 200 µl	EDTA2M	1534230000
Ac. Láctico 100 µl	LAC1M	1200000000
Ac. Láctico 200 µl	LAC2M	94455000

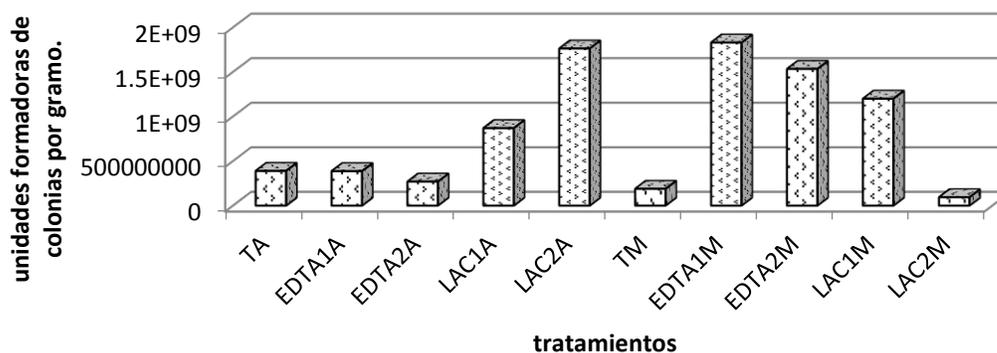


FIGURA. 9 Producción de UFC de *P. chlamydosporia* var *chlamydosporia* en sustrato bifásico a base de maíz y arroz con EDTA y Ac. láctico en dos concentraciones (100 y 200 µl).

1.6 Inhibición de la eclosión de huevos de *N. aberrans* con quitina.

El mayor porcentaje a la inhibición de eclosión en masas de huevos tratados con quitina (HYTC BioQuitina®), se obtuvo posterior a las 96 hr de la evaluación in vitro, inhibiendo la eclosión hasta un 75%, presentando un deterioro de huevos del nematodo.

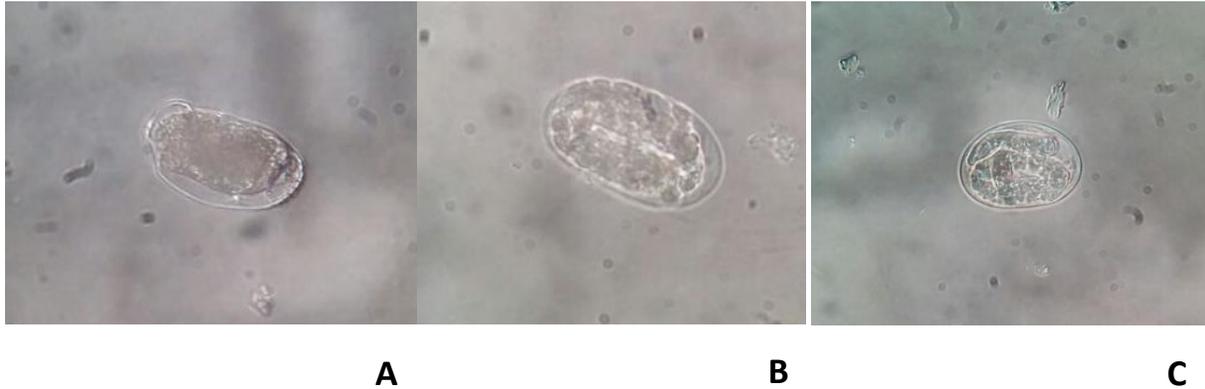


FIGURA. 10 A y B) Deterioro del corión de huevos de *N. aberrans* por el efecto de quitina. C) Huevo control

DISCUSIÓN.

Derivado del muestreo de suelos realizado en parcelas naturalmente infestadas con *Naccobus aberrans* en la Localidad de Coatlinchan, Texcoco, Edo. De México, se obtuvo un aislamiento que se identificó como *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

Respecto a las pruebas de parasitismo de huevos del nematodo realizadas en laboratorio, se obtuvo 86% de parasitismo, en lo que se refiere a otros trabajos donde se realizaron pruebas de parasitismo de huevos pero del nematodo agallador (*Meloidogyne*), Hidalgo *et al.* (2000) encontraron que los porcentajes de parasitismo de *M. incognita*, estaban entre 53 y 73%, mientras que Torres (2014) reportan el 89%. Por su parte, De Leij y Kerry (1991) reportan un parasitismo de 59% sobre huevos de *M. arenaria*, mientras que Pérez, *et al.* 2010 y Franco *et al.* 2012 reportaron un parasitismo por arriba del 80%. En el caso de *N. aberrans* Romero (2009) reporta el 81%, mientras que Doroteo (2006) y Franco-Navarro *et al.* (2006) obtuvieron resultados superiores al 80%, por lo que el buen resultado del parasitismo en este trabajo, lo convierte en un aislamiento potencial como agente de control biológico.

El crecimiento exponencial de este aislamiento en la formación de esporas en medio líquido fue de 2.58×10^{10} UFC ml⁻¹ \pm 4.5 al tercer día en Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD), un mejor número que puede agilizar la producción con respecto a lo reportado por Doroteo (2006), que obtuvo una mayor concentración de clamidosporas y el número más elevado de UFC utilizando arroz líquido y arroz sólido (7.7×10^6 y 1.5×10^7 UFC g⁻¹ de sustrato, respectivamente) a los 15 días.

Con la finalidad de lograr mantener dos sustratos sólidos (arroz y maíz) con una mayor vida en anaquel se probaron dos conservadores (Ac. Láctico y EDTA), esto pudo observarse ya que los matraces con Testigo de ambos sustratos presentaron contaminación a los 20 días de inoculación, mientras que el resto de los tratamientos se observó después de los 40 días, sin perjudicar estos su formación de concentración de UFC, ya que la mayor concentración de estos y clamidosporas se presentaron en los tratamientos de sustrato de maíz quebrado con EDTA (100 µl) y Arroz con A. Láctico (200 µl), con 1.8×10^9 UFC g⁻¹ y con 1.76×10^9 UFC g⁻¹ respectivamente, seguido de maíz quebrado con EDTA (200 µl) con 1.5×10^9 UFC g⁻¹ y maíz quebrado con Ac. Láctico con 12×10^9 UFC g⁻¹ a los 18 días de inoculación, presentando un mejor rendimiento según lo reportado por Doroteo (2006) quien trabajo y comparo ambos sustratos obteniendo la mayor concentración de clamidosporas en maíz quebrado con 13.1×10^6 clamidosporas gr⁻¹ de sustrato a los 21 días posterior a su inoculación. Siendo esta cepa de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* quien por si sola resulta ser una muy buena candidata como agente de control biológico al presentar en los testigos de ambos sustratos un mejor número UFC comparado con lo reportado anteriormente.

El producto agroquímico HYTC BioQuitina®, quitina al 100%, inhibo la eclosión en un 75% presentando un deterioro en huevos del nematodo *N.aberrans* después de las 96hrs., colocándolo como un candidato en la aplicación en campo de este producto como controlador del nematodo agallador.

El presente estudio pudo mostrar una nueva alternativa que pudiera favorecer la producción de *P. chlamydosporia*, sin embargo, es importante el continuo trabajo con este hongo en el mejoramiento de sus técnicas, para determinar estrictamente el tiempo que puede durar en anaquel descartando la contaminación y mejor rendimiento en su aplicación en campo.

CONCLUSIÓN.

- Se obtuvo un aislamiento nativo de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a partir de masas gelatinosas de huevos en la localidad de Coatlinchan, Texcoco, Edo. México que parasitó el 86% de los huevos de la población de *N. aberrans* utilizada.
- El crecimiento exponencial de este aislamiento en la formación de esporas en medio líquido fue de 2.58×10^{10} UFC ml⁻¹ \pm 4.5 al tercer día en Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD).
- El tratamiento que presentó una mayor concentración de clamidosporas y mayor número de unidades formadoras de colonias g⁻¹ de sustrato fue el que consistió en la fermentación sólida con maíz quebrado y EDTA 100μl (1.8×10^9 UFC g⁻¹).
- En general, el maíz quebrado mostró mejores resultados como sustrato de crecimiento de *P. c.* var. *chlamydosporia* con adición de Ac. Láctico y EDTA, comparado con el sustrato utilizado convencionalmente para la producción masiva de este hongo (arroz).
- El producto agroquímico HYTC BioQuitina® (quitina al 100%), inhibió la eclosión en un 75% presentando un deterioro en huevos del nematodo *N. aberrans* después de las 96hr.

CAPITULO III

Desinfestación de suelo en invernadero, infestado por *N. aberrans* mediante el uso de enmiendas orgánicas y reguladores biológicos.

INTRODUCCIÓN.

En México hasta el 2013, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se consideró el principal producto agroalimentario de exportación, con una producción de un poco más de 70 mil hectáreas dedicadas a su siembra, durante el ciclo agrícola 2014 hasta febrero de 2015, según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) se obtuvieron 2.4 millones de toneladas de tomate, esto representó una disminución en un 9% respecto a la producción en el 2013. Estas pérdidas son ocasionadas por problemas fitosanitarios causados por diversos organismos y por el tipo de manejo (Velásquez, 2011). Entre los problemas fitosanitarios que limitan su producción destaca la presencia de los nematodos a formadores de agallas *Meloidogyne* spp. y *N. aberrans*, que puede llegar a ocasionar perdidas hasta del 80% en la producción e incluso ocasionar la muerte de la planta dependiendo del nivel de población y etapa fenológica del cultivo (Cristóbal, *et al.*, 2006; SAGARPA, 2013.; Manzanilla-López, *et al.*, 2002; Cid del Prado, *et al.*, 1997).

Considerando la importancia de la restauración de suelos e incremento de una producción sustentable, se propone la aplicación de alternativas tanto biológicas, como biorracionales, que permitan el desarrollo de una estrategia para el manejo de los nematodos agalladores. Entre estas alternativas se pretende promover el uso del proceso de la biofumigación, mediante esta práctica se obtiene la liberación de glucosa, ácido sulfúrico y compuestos volátiles como isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos, y oxazolidin-2-tionas, productos de la hidrólisis de glucosilanos, que mejoran las propiedades físicas y químicas de suelo de tal manera que favorecen el desarrollo del cultivo y la supresión de plagas y enfermedades (Collange, *et al.*, 2011; Zukerman and Esnard, 1994; Castro, *et al.*, 2011; Bello, *et al.* 2010; Cornell University, 2015) . Dentro de los agentes de control biológico se encuentra el hongo *P. chlamydosporia*, parásito de huevos de *Meloidogyne* spp , *Nacobbus aberrans* y quistes de nematodos (*Globodera* spp., y *Heterodera* spp.), este hongo forma redes de hifas con órganos especializados del micelio que entran en contacto con el corión de los huevos para realizar la penetración, este causa la desintegración de la capa vitelina del corión por la disolución parcial de la quitina y lípidos, consecuencia de la secreción de proteasas (Morgan and Rodríguez., 1985; Kerry, 2000; Zaki and Mahmood., 1996; Manzanilla-López, *et al.*, 2013; Atkins, *et al.*, 2003; Irving and Kerry, 1986).

Como agente biorracional mencionaremos los compuestos orgánicos naturales como la quitina, que genera metabolitos durante la degradación de materiales nitrogenados como la liberación de nitrógeno amoniacal con efecto nematicida, que favorece la activación de la biomasa microbiana e induce o inhibe diferentes actividades bioquímicas durante la interacción de la planta-patógeno, mejorando la tolerancia a una amplia variedad de fitopatógenos, además favorece el crecimiento y la actividad de muchos organismos quitinolíticos, por un efecto sinérgico (Ramírez, *et al.* 2010; MNV, 2000; Synowiecki, 2003; Cohen, 2001; Tharanathan, 2003; Rodriguez-Kabana, *et al.* 1984). Considerando lo anterior en el presente trabajo se evaluó el efecto de incorporación individual y conjunta de enmiendas orgánicas mediante el proceso de la Biofumigación y agentes de control biorracional como la quitina y del hongo *P. chlamydosporia* en la regulación de poblaciones de *N. aberrans*, en el cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero.

MATERIALES Y METODOS.

1. Establecimiento del experimento.

El presente trabajo fue realizado en invernaderos de la localidad de San Diego, Municipio. Texcoco, Edo. México, donde fueron ocupados dos invernaderos de 1200 m², estos presentaron problemas de agallamiento causados por *N. aberrans* durante los ciclos 2014, al término del ciclo de producción fue realizado un muestreo sistemático en suelo en ambos invernaderos, con la finalidad de determinar la existencia de las poblaciones de nematodos y confirmar la presencia de *N. aberrans* (juvenil J2, machos, hembras jóvenes y maduras en raíces). Se realizó un estudio fisicoquímico de suelo antes y después de la aplicación del tratamiento de Biofumigación. También se realizó un muestreo de raíces con agallamiento, con las cuales fue elaborada una escala de severidad modificada, en base a Taylor Sasser (1978) y Sikora and Brigend, (1990).

Se estableció un diseño experimental completamente al azar que consistió de los siguientes ocho tratamientos (**Fig.12**):

- 1) Biofumigación + HYTC BioQuitina® en polvo + *P. chlamydosporia* (B+Q+P)
- 2) Biofumigación + HYTC BioQuitina® en polvo (B+Q)
- 3) Biofumigación + *P. chlamydosporia*.(B+P)
- 4) Biofumigación (B)
- 5) *P. chlamydosporia* (P)
- 6) HYTC BioQuitina® en polvo (Q)
- 7) Control químico (Vydate®) (TQ)
- 8) Testigo absoluto (TA)

Dichos invernaderos comprenden un total de 39 surcos, cada surco represento una unidad experimental con 5 repeticiones. Mensualmente se evaluaron 3 plántulas de cada tratamiento evaluando: altura de las plantas (A) peso fresco y seco de follaje (PFF y PSF), peso seco y fresco de raíz (PFR y PSR) e índice de agallamiento (IA).

El testigo absoluto consistió de surcos experimentales con suelo infestado naturalmente por nematodos, mientras que el testigo químico consistió en la aplicación de oxamil 42% (Vydate®), en una dosis de 1L ha⁻¹, aplicado a los 15 días posteriores al trasplante en sistema de riego por goteo.



FIGURA. 11 Proceso de Biofumigación: A) trituración y aplicación de brócoli, estiércol. Mezcla y riego (capacidad de campo). B) Recubrimiento con plástico, C) para la unión de este se utilizó Resistol 5000 y fueron realizadas zanjas para recubrir los extremos de la superficie.

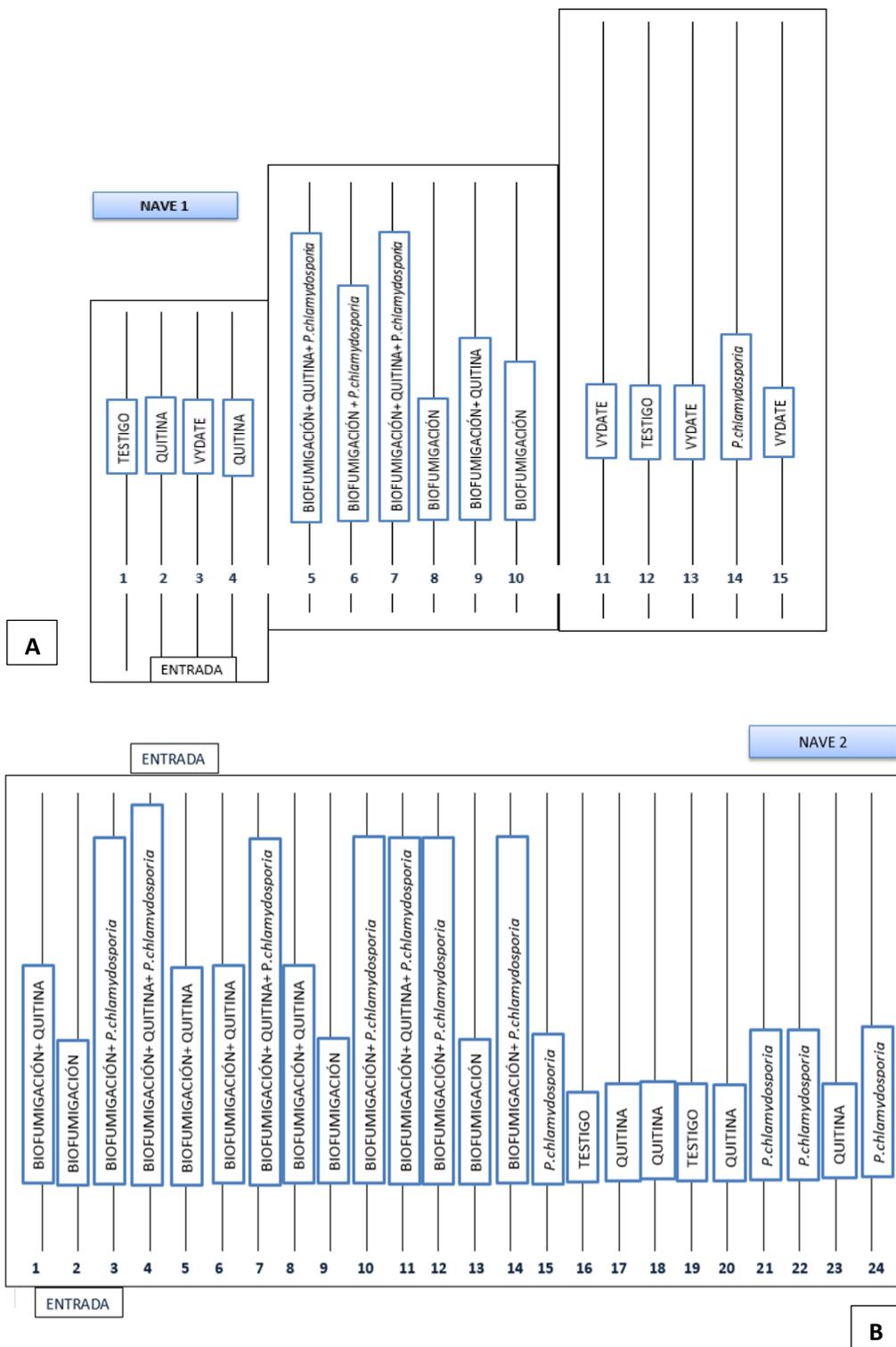


FIGURA. 12 .Diseño experimental completamente al azar en la Localidad de San Diego, Texcoco; A) La nave 1 comprende de 15 surcos, B) Mientras que la Nave 2 comprende de 24 surcos.

1.2 .Biofumigación.

Las enmiendas orgánicas utilizadas para la biofumigación fueron: estiércol de vaca, producida en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, así como fragmentos de brócoli, 40 días antes del trasplante. La aplicación del tratamiento de biofumigación fue la siguiente: la dosis aplicada fue de 3.9t de brócoli y 2 t de estiércol de vaca para 1305 m² en la nave 2, mientras que para la nave 1 fue de 2.5 t de brócoli y 1.5 t de estiércol de vaca para 765m², aplicándose una dosis de 2.9 T de brócoli y 1.5 T estiércol de vaca por 1000 m², esta dosis se estableció en base a trabajos anteriores donde se utilizó material orgánico (Franco-Navarro, 2002; Pérez-Rodríguez, 2010). El brócoli fue triturado y ambos se incorporaron al suelo mezclando cada enmienda en todo el área de suelo por tratamiento (Fig 8), se regó a capacidad de campo y se cubrió con un plástico transparente (calibre 7, 150 micras aproximadamente), este se dejó en la área tratada por 30 días, después de los cuales fue descubierto, se rompió la capa superficial del suelo para dejarlo airear por 10 días antes del trasplante, procurando evitar pérdida de humedad y fomentando la eliminación remanente de gases.

1.3 . *P. chlamydosporia*.

P. chlamydosporia var. *chlamydosporia* se propagó en maíz quebrado y se aplicó en los tratamientos correspondientes a una dosis mensual de 30ml del hongo ($2.6 \times 10^6 \pm 1.8$ UFC/ml) por tallo de la planta; utilizando agua como vehículo (Pérez Rodríguez *et al.*, 2007). Se utilizaron dos bolsas de maíz quebrado en 20L de agua, los cuales fueron mezclados.

1.4. Quitina

La HYTC BioQuitina® (100% quitina) en polvo fue aplicada con dosis de 1kg por 382 m², disuelta en agua como vehículo y con 24 hr. de fermentación (Portillo, 2010). Se vertieron 30ml de la solución en cada tallo de la plántula.

El resto de los tratamientos que consistieron en la combinación de los anteriores (Biofumigación + Quitina + *P. chlamydosporia*, Biofumigación + quitina, y Biofumigación

+ *P. chlamydosporia*) fueron aplicados de la misma manera, mezclando el maíz quebrado en la quitina fermentada para facilitar su aplicación.

2. Extracción de nematodos

Se utilizó el método de Tamizado-centrifugado (Ayoub, 1977; Hooper; 1986) modificado. La muestra de suelo se homogenizo y se tomaron 200g de suelo los cuales se depositaron en una jarra con dos litros de agua, pasándose de una jarra a otra el suelo se mezcló durante 30 segundos para posteriormente únicamente la parte líquida de la mezcla por el tamiz de 60 mallas y se colectó en una cubeta limpia, esta cubeta se pasó por el tamiz de 400 mallas y coleccionar. El material coleccionado se homogenizo en dos tubos de ensayo para centrifugarlos a 2500 rpm durante 5min. Una vez que concluyo la centrifugación se decantó el sobrenadante de los tubos y se reemplazó por sacarosa al 46% (450gr/1L), se homogenizo perfectamente, y rápidamente los tubos fueron sometidos nuevamente a centrifugación durante 1 minuto a 1500 rpm. El sobrenadante de estos tubos se pasaron por un tamiz de 400 mallas y la suspensión se colectó en frascos de vidrio para su posterior observación.

3. Evaluación de plántulas de jitomate.

- Peso Fresco de follaje (PSF). Para tal fin se cortó parte la parte aérea de cada planta y se pesaron. En el Peso seco de follaje (PSF). Las plantas se colocaron en bolsas de papel debidamente etiquetadas dentro de una estufa a 40°C durante 72hr.
- Peso fresco de raíz (PSR). En este caso, primeramente las raíces se lavaron para eliminar el exceso de suelo, posteriormente se escurrieron para eliminar el exceso de agua y finalmente se pesaron, en el caso de su peso seco, se realizó el mismo procedimiento que para follaje.

RESULTADOS

1. Identificación del nematodo agallador en campo.

En la evaluación previa del predio experimental por medio de muestras de suelo y raíces, pudo observarse hembras, macho y juveniles de *N. aberrans*, que se caracteriza por el marcado dimorfismo sexual que presenta los estados adultos, ya que el cuerpo de las hembras presenta una forma de huso o saco, mientras los machos se mantienen vermiformes. Las hembras presentan solo un solo ovario dirigido anteriormente, mientras que los machos presentan un testículo, un par de espículas y ala caudal terminal o pelodera.

1. Escala de severidad.

Para determinar el Índice de agallamiento (IA) se realizó una escala modificada de severidad (Fig. 13), en la que existen 7 niveles de agallamiento, siendo el 0 una raíz sana y 7 el máximo agallamiento encontrado, ya que dicha escala fue realizada con las raíces que presentaron el síntoma de agallamiento en el ciclo 2014, la cual se determinó con base al número de agallas por raíz y las escalas propuestas por Taylor Sasser (1978) y Sikora and Brigend, (1990).

TABLA 11. Escala de severidad para evaluar el índice de agallamiento *causado* por *N. aberrans* en jitomate.

Escala	Número de agallas en el sistema radical
0	Sin agallas (raíces sanas)
1	1-15
2	16-35
3	36-50
4	51-75
5	76-110
6	110-160
7	<160 (Engrosamiento de raíces principales <0.5cm)



FIGURA. 13. Escala de severidad, realizando con las raíces del lugar de estudio en base a la escalas propuestas por Sikora and Brigend, (1990) y Taylor Sasser (1978).

2. Evaluación de la fauna nematológica.

La evaluación de la fauna nematológica con diferentes hábitos tróficos antes de la aplicación de los diferentes tratamientos en 200gr de suelo utilizando el método de Tamizado centrifugado modificado (Ayoub, 1977; Hooper, 1987) para su extracción, fue la siguiente: se observó la presencia de nematodos fitopatógenos siendo la familia Criconematidae los de mayor abundancia con 185 individuos, seguidos de la población de *N. aberrans* con 112 individuos juveniles estadio dos y 84 adultos machos con un IA 7 en escala de severidad, observando también poblaciones de los géneros; *Meloidogyne* (J2) con 74 individuos, 65 *Tylenchorhynchus* sp. , 20 *Helicotylenchus* sp. y 12 *Aphelenchus* sp.

También se observaron nematodos de vida libre del orden 85 Dorilaimida, 79 Rhabditida, 125 Diplogasterida con una mayor proporción que algunos de los nematodos fitopatógenos y del genero *Tylenchus sp.* con la menor población de todos los anteriores.

El muestreorealizado al término de la evaluación del experimento posterior a el tratamiento de biofumigacion fue evidente la reducción de la población de los nematodos fitopatógenos como son los géneros *Helicotylenchus sp*, *N. aberrans*, *Meloidogyne sp*, *Tylenchorhynchus sp* y el incremento de los de vida libre, encontrándose 252 Rhabditida, 292 Dorilaimida y 63 *Tylenchus sp.*

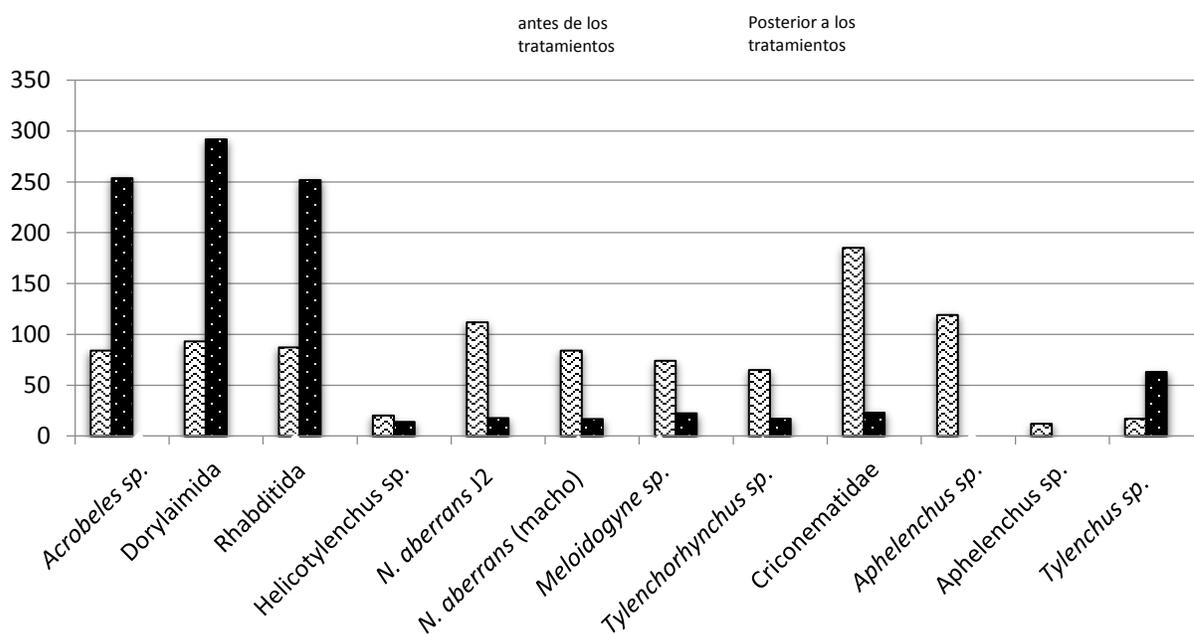


FIGURA. 14 Fauna nematológica antes de la aplicación de los tratamientos y posterior al tratamiento de biofumigación.

3. Evaluación de población de *N. aberrans* por tratamiento durante la experimentación.

En surcos de suelo testigo absoluto las poblaciones de juveniles de *N. aberrans* se presentaron en cada una de las evaluaciones, siendo a los 120 días posteriores al trasplante (dpt) la presencia de 46 individuos por 200 g, mientras que para los demás tratamientos se observaron 4 juveniles dos a partir de los 60 días para los tratamientos con adición de *P. c. var. chlamydosporia* posteriores a la biofumigacion (B+P) y biofumigacion (B), teniendo su mayor numero con 6 y 13 J2 a los 120 y 150 días posteriores a el transplante (dpt)

respectivamente, siendo el tratamiento de adición de quitina y *P. chlamydosporia* posterior a la biofumigación (B+P+Q), el que no presento juveniles hasta los 150 dpt con 4 J2, mientras que *P. chlamydosporia* presento el mayor número de J2 con 15 individuos en comparación con los tratamientos biológicos a los 150 dpt (Fig. 15).

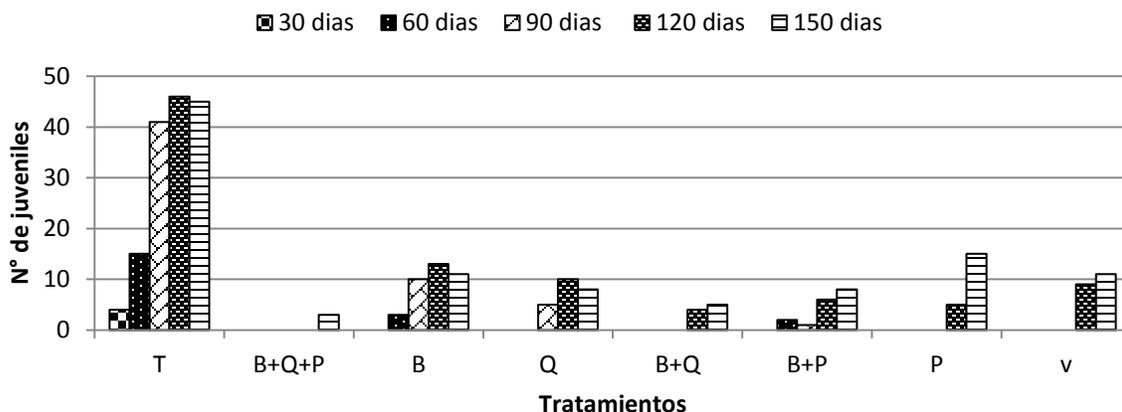


FIGURA. 15. Efecto de la aplicación de los tratamientos en poblaciones de juveniles de *N. aberrans* (J2) en suelo (200g) de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero. Tratamientos: TA= Testigo Absoluto, B= biofumigación, P= *P. c. var. chlamydosporia*, Q= quitina, B+P= biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia*, B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q= biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia* + quitina, TO= Testigo químico (oxamil).dpt=días posteriores al trasplante.

4. Efecto de los tratamientos en el área foliar.

Para la variable altura, se observó una diferencia significativa ($P=0.05$) entre el testigo absoluto (TA) con el resto de los tratamientos al observarse el 30% de su reducción, con una altura de 33,54, 87, 138 y 183 cm durante los 30, 60, 90, 120 y 150 dpt respectivamente, siendo el tratamiento de biofumigación (B) el de mayor altura durante los 30 dpt con 67cm, adición de quitina posterior a la biofumigación (BQ) con 95cm y 222cm durante los 60 y 150 dpt respectivamente, BP con 154 y 181 cm durante los 90 y 120 dpt respectivamente (Fig 16, Tabla 11).

En el Peso fresco de follaje (PFF) no existió diferencia estadísticamente significativa en ninguna de sus evaluaciones, sin embargo los tratamientos de Biofumigación +quitina (B+Q), Biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia* +quitina (B+P) y *P. c. var.*

chlamydosporia (P) fueron los que obtuvieron una mayor biomasa con 160 ,155 y 145 g de la media obtenida de las cinco evaluaciones respectivamente, en comparación con el resto de los tratamientos, siendo el testigo absoluto (TA) el que presento el menor valor con 85 g de la media obtenida en las cinco evaluaciones. En el caso del peso seco de follaje (PSF) se observó una diferencia estadísticamente significativa (P=0.5) durante los 90 y 120 dpt, en ambas evaluaciones se observó una menor biomasa; el tratamiento del testigo absoluto(TA) con 14 y 22 g que represento un reducción del 28 y 37% respectivamente en comparación con el PSF del tratamiento de B+P+Q, que obtuvo la mayor biomasa con 36 y 40 g respectivamente, para el caso de los 30, 60 y 150 dpt, no se observó una diferencia significativa entre los tratamientos, sin embargo el TA se mantuvo con la menor biomasa con 13, 20 y 28g respectivamente, mientras que la mejor biomasa la obtuvo BQ durante los 30 dpt con 17 g, BP con 28 g durante los 60 dpt y B+P+Q con 38 g durante los 150 dpt (Fig. 17,Tabla.11).

TABLA 11. . Evaluación del Peso seco de follaje, de los tratamientos aplicados sobre plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) crecidas en suelo naturalmente infestado por *Nacobbus aberrans* en invernadero durante los 30, 60, 90, 120 y 150 días posteriores al trasplante.

Ta= tratamiento absoluto, B= biofumigación, P= *P. chlamydosporia.*, Q= quitina, B+P= biofumigación + *P. chlamydosporia*, B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q= biofumigación+ *P. chlamydosporia*+quitina, TQ= Testigo químico (Oxamil).

A= 30 días posteriores al trasplante (dpt), B= 60 dpt, C= 90 dpt, D= 120 dpt, E= 150 dpt.

Clave del tratamiento	Peso fresco de follaje (PFF) (g)					Peso seco de follaje (PSF) (g)				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
TA	31 a	77a	96 a	113 a	221 a	10 a	12 a	14 ab	22 a	32 a
B	37 a	93 a	149 a	154 a	228 a	9 a	27 a	32 a	36 ab	36 a
P	41 a	118 a	159 a	212 a	229 a	8 a	26 a	31 a	34 ab	34 a
Q	33 a	100 a	105 a	185 a	234 a	12 a	23 a	32 a	35 ab	32 a
B+P	32 a	120 a	126 a	180 a	196 a	11 a	28 a	33 a	38 ab	39 a
B+Q	31 a	138 a	161 a	214 a	255 a	17 a	20 a	24 ab	31 ab	31 a
B+P+Q	39 a	136 a	152 a	179 a	237 a	9 a	26 a	36 a	40 a	44 a
TQ	35 a	90 a	115 a	171 a	220 a	13 a	20 a	24 ab	27 ab	28 a

*= Análisis de varianza con significancia con $\alpha=0.05$, CV= Coeficiente de variación.

En cada columna con letras similares no son diferentes significativamente (Tukey P = 0.05).

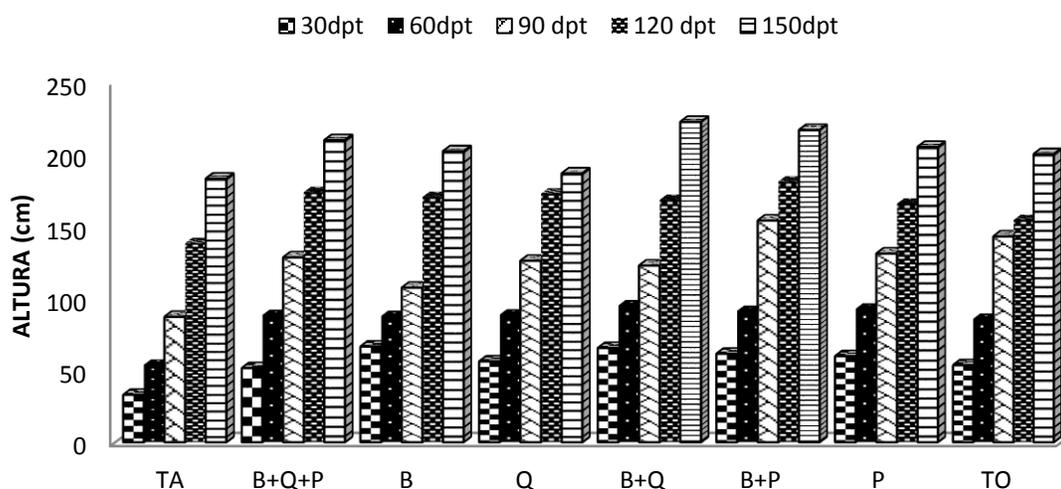


FIGURA. 16 Efecto de la aplicación de varios tratamientos sobre la altura en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero. Tratamientos: TA= Testigo Absoluto, B= biofumigación, P= *P. c. var. chlamydosporia*, Q= quitina, B+P= biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia*, B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q= biofumigación, TO= Testigo químico (oxamil).dpt=días posteriores al trasplante.

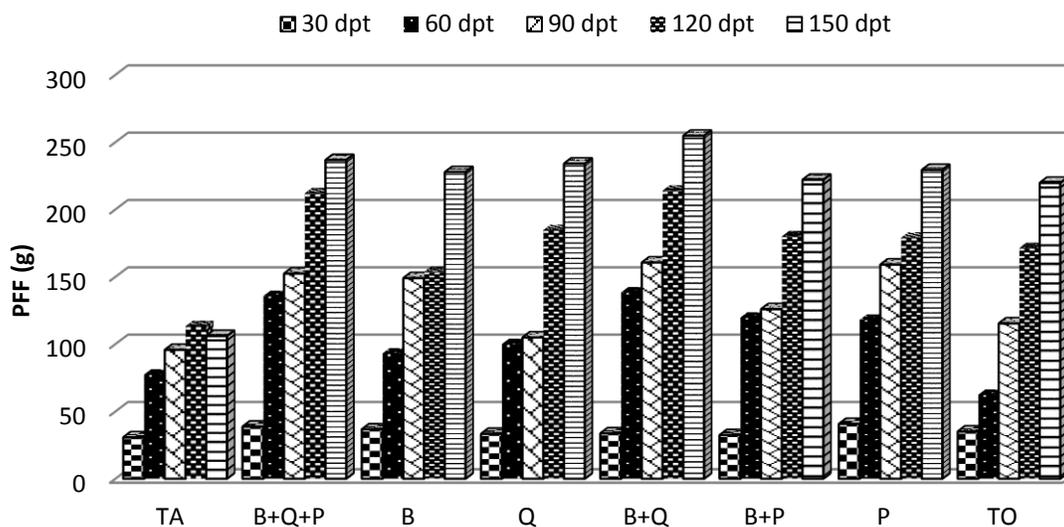


FIGURA. 17 Efecto de la aplicación de varios tratamientos sobre el peso fresco de follaje en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero. Tratamientos: TA= Testigo Absoluto, B= biofumigación, P= *P. c. var. chlamydosporia*, Q= quitina, B+P= biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia*, B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q= biofumigación, TO= Testigo químico (oxamil).dpt=días posteriores al trasplante.

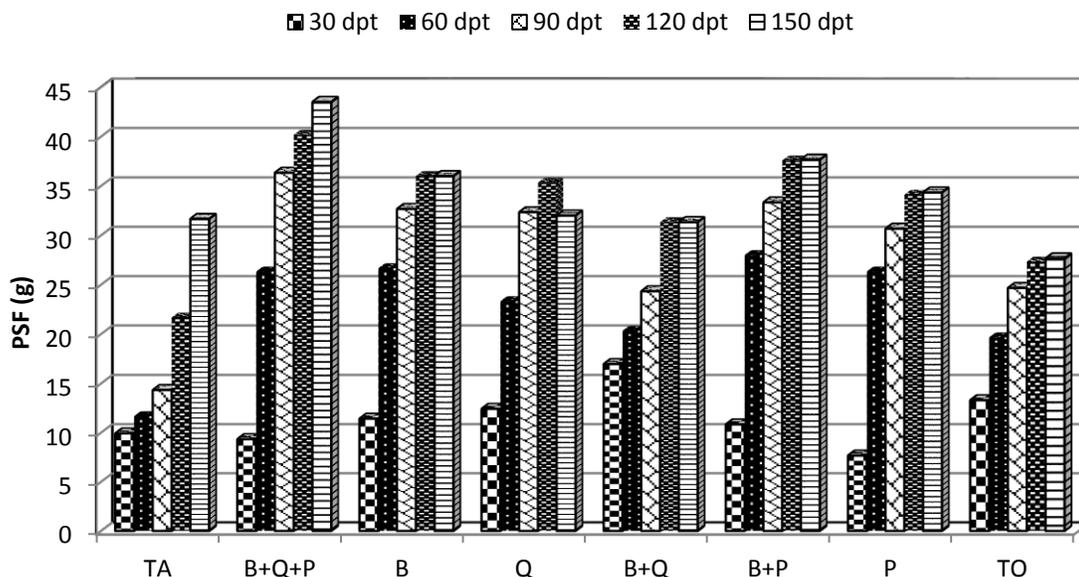


FIGURA. 18 Efecto de la aplicación de varios tratamientos sobre el peso seco de follaje en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero. Tratamientos: TA= Testigo Absoluto, B= biofumigación, P= *P. c. var. chlamydosporia*, Q= quitina, B+P= biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia*, B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q= biofumigación, TQ= Testigo químico (oxamil).dpt=días posteriores al trasplante.

5. Efecto de los tratamientos en el Índice de Agallamiento.

Para el Índice de agallamiento (IA), existió una diferencia significativa ($P=0.05$) del testigo absoluto con todos los tratamientos presentando el mayor agallamiento en raíces en todas las evaluaciones, teniendo un IA de 1, 3, 6, 7, 7 en escala de severidad para los 30,60,90,120 y 150 dpt respectivamente, mientras que el tratamiento B+P+Q, presento el menor índice de agallamiento en comparación con el resto de los tratamientos con un nivel de 1 en escala de severidad, con una reducción del 70% en agallamiento de raíz, seguido del tratamiento B+Q y B que expreso un buen efecto como controlador del nematodo falso nodulador, al presentar el tratamiento de B+Q un IA de 2 en escala de severidad a los 150 días de evaluación posteriores al trasplante con una reducción del 71% de agallamiento y Biofumigación con una reducción de agallamiento del 57% con un IA de 3 en escala de severidad (Tabla. 12). El testigo químico (oxamil) ofreció una reducción en el IA al presentar 0 en escala de severidad durante las primeras dos evaluaciones (30 y 60 dpt) para después ser uno de los tratamiento que presento IA de 6 en escala de severidad con un

Tabla 12. Evaluación del Peso fresco de raíz (gr), peso seco de raíz (gr), de los tratamientos aplicados sobre plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) crecidas en suelo naturalmente infestado con *Nacobbus aberrans* en invernadero durante los 30, 60, 90, 120 y 150 días posteriores al trasplante.

Tratamientos	30dpt.			60dpt.			90dpt.			120dpt.			150dpt.		
	IA	PFR	PSR	IA	PFR	PSR	IA	PFR	PSR	IA	PFR	PSR	IA	PFR	PSR
TA	1 a	1 b	2 a	3.6 a	11 a	10 a	5.3 a	45 a	15 a	7a	56 a	19 a	7 a	55 a	22 a
B	0 b	1 b	1 b	0.6bc	9 a	8 a	1.3 b	13 b	8 b	0.6 b	13 b	9 b	3.6ab	28 b	9 a
P	0 b	1 b	1 b	0 c	12 a	8 a	1.6ab	10 b	7 b	0.6 b	16 b	7 b	3 b	27 b	8 a
Q	0 b	3 a	1 b	0.3bc	8 a	6 a	1 b	11 b	6 b	1 b	12 b	6 b	4 ab	26 b	7 a
B+P	0 b	1ab	1 b	2.3ab	8 a	3 a	0 b	15 b	5 b	1.3 b	15 b	5 b	2 b	22 b	7 a
B+Q	0 b	2 a	1 b	0 c	9 a	3 a	1 b	11 b	5 b	0.6 b	11 b	4 b	0.3 b	21 b	6 a
B+P+Q	0 b	3 a	1 b	0 c	11 a	3 a	0.3 b	8 b	5 b	0.3 b	8 b	3 b	1.6 b	23 b	5 a
TO	0 b	1 b	1 b	0 c	6 a	3 a	2 ab	9 b	5 b	1.3 b	10 b	2 b	3.3ab	24 b	4 a
CV	0.35	0.89	0.35	1.35	1.98	2.87	1.64	12.22	3.75	2.21	15.72	5.38	1.98	12.22	5.68

Ta= tratamiento absoluto, B= biofumigación, P= *P. chlamydosporia.*, Q= quitina, BP= biofumigación + *P. chlamydosporia*, BQ= biofumigación+ quitina, BPQ= biofumigación+ *P. chlamydosporia*+quitina, TO= Testigo químico (Oxamil). IA=índice de agallamiento, PFR= peso fresco de raíz, PSR= peso seco de raíz. dpt= días posteriores a el transplante. CV= Desviación estándar.

En cada columna con letras similares no son diferentes significativamente (Tukey P = 0.05)

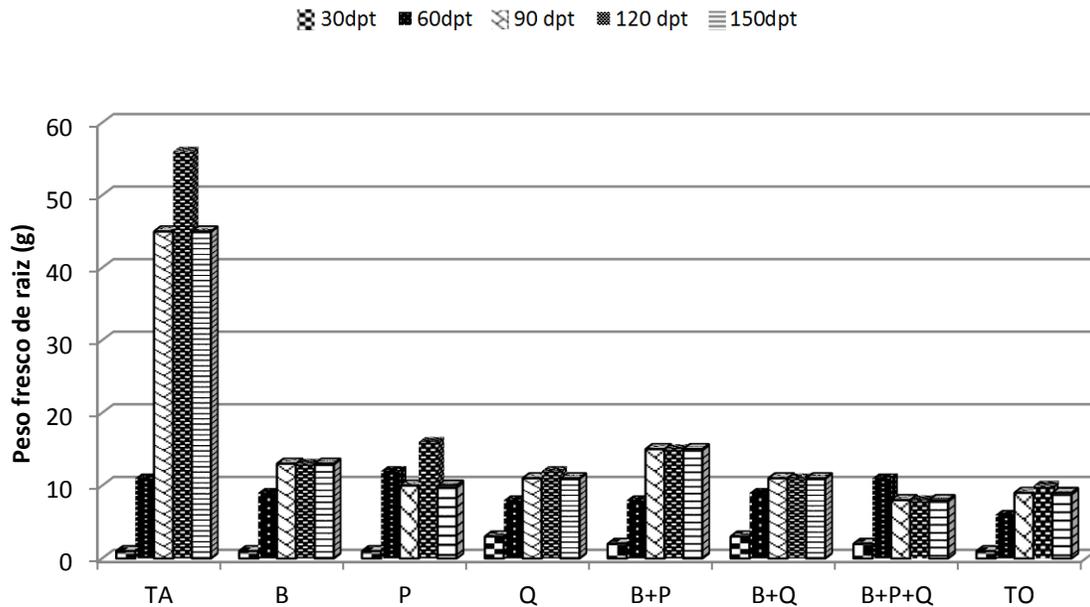


FIGURA. 19. Efecto de la aplicación de varios tratamientos sobre el peso fresco de raíz en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero. Tratamientos: TA= Testigo Absoluto, B= biofumigación, P= *P. c. var. chlamydosporia*, Q= quitina, B+P= biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia*, B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q = biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia* + quitina, TO= Testigo químico (oxamil).dpt=días posteriores al trasplante.

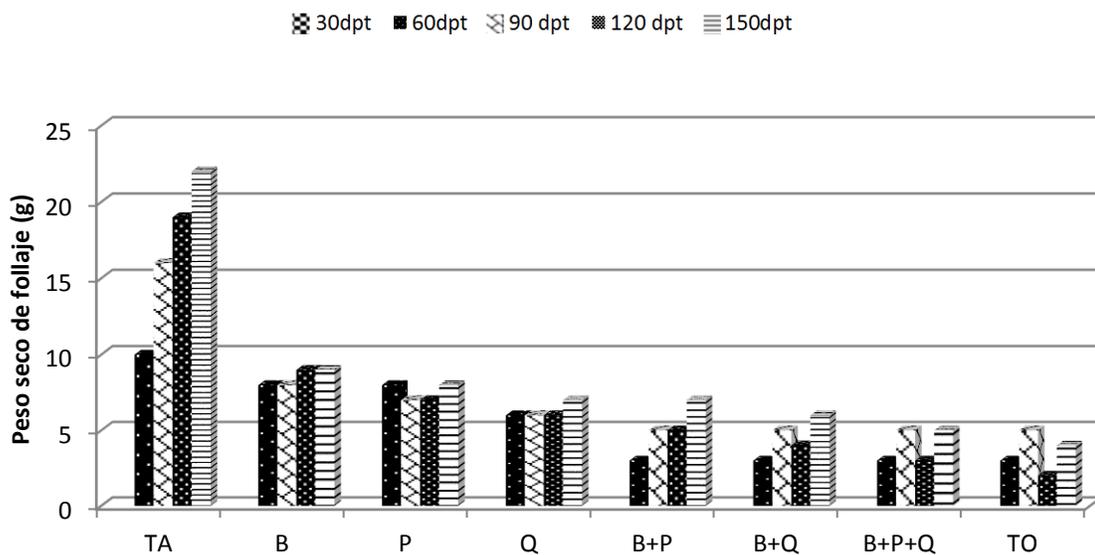


FIGURA. 20. Efecto de la aplicación de varios tratamientos sobre cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero. Tratamientos: TA= Testigo Absoluto, B= biofumigación, P= *P. c. var. chlamydosporia*, Q= quitina, B+P= biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia*, B+Q= biofumigación+ quitina, B+P+Q= biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia*+ quitina, TO= Testigo químico (oxamil).dpt=días posteriores al trasplante.

agallamiento en raíz del 85%, esta última respuesta posiblemente debido a que se le considera ligeramente persistente hasta 3 semanas, además que en condiciones anaerobias, la oxidación a CO₂ y su incorporación a la materia orgánica es lenta.

En relación con el peso fresco de raíz (PFR) (Tabla 12, Fig.19), la diferencia significativa entre los tratamientos se expresó para los 30, 90, 120 y 150 dpt, siendo el testigo absoluto el de mayor peso con 3, 45, 56 y 45 g para las últimas tres evaluaciones, en comparación con el tratamiento B+P+Q que presentó el menor peso con 8g en las últimas 3 evaluaciones.

Pochonia chlamydosporia var. *chlamydosporia* se reaisló de suelo en cada uno de los tratamientos donde fue aplicado; su densidad fue mayor en aquéllos en los que el hongo se combinó con quitina y Biofumigación, e incluso formando una costra de micelio alrededor del tallo. El número de UFC en suelo fue mayor en el tratamiento donde se aplicó el hongo en combinación de todos los tratamientos biológicos (Biofumigación+ *P. chlamydosporia* + quitina) con 14000 UFCg⁻¹ (Fig.7), seguido de B+P con 12500 UFCg⁻¹ y por último *P. chlamydosporia* con 13000 UFCg⁻¹.



Fig. 21. Crecimiento de *P. c. var. chlamydosporia* como efecto de la aplicación del tratamientos (A) B+P+Q= biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia*+ quitina y (B) B+P= biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia*, sobre cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero con suelo naturalmente infestado por *N.aberrans*. (C) Re aislamiento de *P. c. var. chlamydosporia* de suelo inoculado por este hongo

DISCUSIÓN.

La aplicación de materia verde al suelo obtuvo el mayor incremento de biomasa (peso seco de follaje) en el tratamiento B+P+Q con 31 g, media obtenida de las cinco evaluaciones, teniendo como mayor beneficio las modificaciones físicas, químicas y biológicas que ocurren en el suelo al ser utilizadas (Zavaleta-Mejía, 2007), al realizar una evaluación del suelo antes y después de los tratamientos se observó modificaciones físico químicas como son; pH 8, 5.9% en conductividad eléctrica, 2.31% en materia orgánica, N total de 0.16%, 2.12 cmol Kg⁻¹ Na, 1.95 cmol Kg⁻¹ Mg, 2.7 cmol Kg⁻¹ K y un cambio de textura de suelo arcilloso a un suelo con textura arenosa. Para Villa-Briones et al. (2008), las enmiendas por sí mismas pueden favorecer un mejor desarrollo del cultivo, independiente de que los nematodos fitopatógenos estén presentes o ausentes en suelo, sin embargo pudo observarse una modificación notable en la población de nematodos, antes de la aplicación de los tratamientos estuvieron presentes poblaciones de los géneros de *N. aberrans* (J2) con 112, *Meloidogyne* (J2) con 74 individuos, 65 *Tylenchorhynchus* sp. , 20 *Helicotylenchus* sp., *Tylenchus* sp y 12 *Aphelenchus*, en 200 gr de suelo, finalizando los tratamientos con poblaciones de nematodos de vida libre como son los órdenes 252 Rhabditida, 292 Dorilaimida y 63 *Tylenchus* sp. Además de favorecer el incremento de biomasa al proporcionarle mayores nutrimentos a la plántula, observándose en el presente trabajo al ser el tratamiento biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia* + quitina (B+P+Q) el que presento una mayor biomasa, como se esperaba, ya que estos dos insumos (abonos orgánicos y quitina) han demostrado en trabajos anteriores un potencial en el control de nematodos (Cohen, 2001; Oka y Yermiyahu, 2002; Oka, 2010; De Jin et al., 20015; Franco et al., 2002).

El incremento de biomasa también pudo observarse en respuesta de la aplicación de quitina, como lo cita Castro, et al. 2011, este material rico en nitrógeno, podría favorecer por medio de la activación de la biomasa microbiana, la producción de sustancias promotoras de crecimiento o la liberación de nutrientes propios o presentes en el abono y contribuir así el

desarrollo de la planta, esto se vio reflejado en el peso seco de follaje (PSF), en donde el tratamiento de adición de quitina posterior a la biofumigación (BQ) presentó un mayor peso en comparación con el resto de los tratamientos y que se vio reflejado el peso seco de follaje, al ser uno de los tratamientos con este insumo, el de mejor respuesta. Los tratamientos con mejor altura incluían la biofumigación individualmente y con adición de quitina los de mejor altura. Es importante considerar que el invernadero fue saturado en cuanto a la población del hospedante con 86-90 plántulas por surco, por lo que el comportamiento de la última evaluación al no expresarse en beneficio de los tratamientos significativamente, pudo verse afectado debido a que las plantas al igual que muchos organismos tienen interacciones negativas cuando compiten por un recurso esencial que es limitado, la densidad de los individuos en el espacio modifica la disponibilidad de los recursos como la luz, a medida que los individuos se aproximan las interacciones se vuelven cada vez más negativas, la competencia intraespecífica generalmente conduce a una reducción o estancamiento del crecimiento y desarrollo de los individuos debido a los cambios en las cantidades de los recursos en reserva (Vera et al, 2006).

La reducción del índice de agallamiento (IA) fue observado con mejor resultado para el tratamiento de B+P+Q, al presentar una reducción del 70% en agallamiento con un IA de 1 en escala de severidad. Por lo anterior podemos decir que, la adición de quitina al suelo provoca un resultado adverso sobre las poblaciones de nematodos (Oka y Yermiyahu 2002, De Jin et al. 2005), posiblemente como consecuencia de la producción de compuestos nitrogenados tóxicos como el amoníaco y el ácido nitroso (Oka 2010), y a su capacidad para incrementar la actividad de microorganismos quitinolíticos capaces de degradar la quitina presente en los huevos (Shubakov y Kucheryavykh 2004, De Jin et al. 2005) . Estimulando las actividades de la microflora quitinolítica en el suelo (Rodríguez-Kábana, Boube y Young 1990). Muchos microorganismos quitinolíticos son efectivos en la destrucción de huevos de nematodos y micelios de algunos hongos fitopatógenos como es el caso del hongo nematófago *P. c. var. chlamydosporia*. Estos tratamientos pueden contribuir al control de enfermedades de origen edáfico particularmente cuando se combinan con otras alternativas, (Gamliel y Stapleton 1993), por ejemplo la adición de enmiendas orgánicas en el proceso de biofumigación, ya que tiene el potencial de modificar la estructura del suelo e influir sobre las poblaciones microbianas (Oka, 2010), además de

la liberación de compuestos volátiles y no volátiles como glucosilatos, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados (NH₃) y azufrosos a partir de la descomposición de residuos orgánicos con propiedades nematicidas (Meyer et al., 2009; Cayuela et al., 2008). Abawi y Windmer (2000) han indicado que durante la descomposición de los residuos orgánicos se producen sustancias tóxicas volátiles y no volátiles que inhiben los nematodos parásitos de plantas tales como cianuro de hidrógeno, nitrilos e isotiocianatos.

Los abonos orgánicos pueden introducir microorganismos al suelo o bien aumentar la microflora existente, lo que puede afectar negativamente las poblaciones de nematodos ya sea por depredación, parasitismo y competencia por sitios de infección o alimentación sobre la raíz, como pudo observarse al presentarse una población mayor en nematodos de vida libre y la presencia de micofagos como el género *Tylenchus* (Oka, 2010, Akhtar, 2000), esto se observó en el caso donde esta práctica y la adición de quitina fueron combinadas con la inoculación de *P. chlamydosporia*, al beneficiar su presencia en el suelo, en comparación con los tratamientos donde actúa solamente el hongo, al no tener la presencia de alimento dispuesto, lo hace competir con otros organismos por materia orgánica y espacios en la rizosfera de la raíz, afectado al exponerse a condiciones climáticas inestables que pueden afectar su desarrollo y el efecto del parasitismo que en un momento dado el hongo pueda ejercer sobre *N. aberrans* (Kendrick, 2000).

Los aumentos de población de organismos beneficiosos en el suelo parecen ser el resultado directo de los cambios ambientales provocados por las modificaciones después de la adición al suelo. Esto sugiere que para sostener supresivo el suelo, las modificaciones deben volver a aplicarse periódicamente para mantener el ambiente del suelo propicio para antagonistas (Bello et al, 2010), sin embargo, el mayor problema en el uso de enmiendas orgánicas es la heterogeneidad en la composición de las materias utilizadas para su preparación (Stirling 1991). La normalización de la composición de las y el control de calidad, es un área de desarrollo que requiere una metodología apropiada. Algunas enmiendas orgánicas tienen el potencial para acumular compuestos perjudiciales o aumentar el nivel de inóculo de algunos patógenos edáficos (Rodríguez-Kábana 1986). et al. 2007, Gortari y Hours 2008). Esto podría explicar la repuesta en el incremento de la población del nematodo para la última evaluación del cultivo (150 dpt). Franco, 2002,

explica que los estadios J3 y J4 (los estadios más importantes dentro del ciclo infectivo) suelen protegerse estando dentro de los residuos de las raíces que permanecen en el suelo, manteniendo así su infectividad aun cuando son expuestos a condiciones desfavorables y en ausencia de un hospedante susceptible. A pesar de que fueron retiradas los residuos de raíces después del ciclo de cultivo anterior en el invernadero donde se aplicaron los tratamientos del presente trabajo, solo pudo retirarse las raíces expuestas a medio metro de profundidad y las raíces del tomate generalmente se extiende a un diámetro de 1.5 m y alcanza más de 0.5 m de profundidad y si son tratadas con enraizadores en ciclos anteriores, como fue el caso, puede extenderse a una profundidad mayor a lo habitual, por lo que el inóculo estaría presente en el invernadero en ciclos futuros. De aquí se destaca la importancia de la continua y correcta aplicación de estas técnicas biorracionales, para el mejor manejo de este patógeno que es favorecido por su complejo ciclo de vida.

CONCLUSIÓN.

- La combinación de tres de los tratamientos (biofumigación+ *P. c. var. chlamydosporia* + quitina (B+P+Q),) fue el tratamiento que dio mejor resultado en las variables evaluadas, con un máximo índice de agallamiento de 1 en escala de severidad, con una reducción del 70% en agallamiento, por consiguiente menor biomasa en raíz con 3.4 g en peso seco (PSR), aumento de biomasa en follaje (PSF) con 155g y el segundo con mejor altura de la plántula con 155cm, en las medias obtenidas de las 5 evaluaciones..
- El segundo tratamiento con mejor respuesta fue BQ con una altura de 222 cm a los 150 dpt con y IA de 2 en escala de severidad a los 150 días de evaluación posteriores a el transplante con una reducción del 71% de agallamiento. Obteniendo la mayor biomasa con 31g en peso seco de follaje de la media obtenida de las cinco evaluaciones.
- *P. chlamydosporia* pudo ser reaislamdo a partir de suelo y raíces.

LITERATURA CITADA.

Abawi G.S., Wildemer T.L. 2000. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens,

nematodes and root diseases of vegetable crops. *Applied Soil Ecology*. 15:37-47.

Atkins SD, Hidalgo DL, Kalisz H, Mauchline TH, Hirsch PR and Kerry BR. 2003. Approaches for monitoring the release of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, a biocontrol agent of root-knot nematodes. *Mycological Research* 107:206-212.

Agrios, N. G., 2005. En: *Plant Pathology*. London: Elsevier, p. 922.

Gortari , M. C. & Hours, R. A., 2008. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycol Progress* , Volumen 7, pp. 221-238.

Guillon, M. Production of biopesticides: scale up and quality assurance. In: British crop production council symposium, 68, 1997, Farnham. Insecticides: novelty or necessity: proceedings. Farnham: The British Crop Protection Council, 1997. p.151-162.

Barres, M., Bello, A., Jorda, C. & Tellez, J., 2006. La eliminacion de bromuro de metilo en la proteccion de cultivos como modelo mundial para la conservacion del medio ambiente. *MAPA.Madrid.*, p. 515.

Barret, S. y otros, 2003. Fungi are the predominant microorganisms of soil responsible for degradation of soil buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities. *Journal of applied miccrobiology*, Volumen 95, pp. 78-85.

Bello Lopez, A. y otros, 2000. *Biofumigation and organic amendments.Regional Workshop on Methyl Bromide.alternatives for North Africa and southern European Countries..* Francia, United Nations Environment Programe (UNEP), pp. 113-141.

Bello, A. y otros, 2010. Biodesinfestacion de suelos. *Sociedad Española de Agricultura Ecologica (SEAE). Ministerio de medio ambiente, Medio rural y marino, Madrid.*

Bird, A., 1971. Family naccobidae.. En: *The structure of nematodes..* New York.: Academic Press, p. 318pp..

Bonkowski, M., Griffith, B. & Ritz, K., 2000. Food preference of earthworms for soil fungi. *Pedobiologia*, Volumen 44, pp. 666-676.

Bordjiba, O., Kadri, R., Semadi, M. & Guiraud, P., 2001. Ramoval of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. *Journal of evironmental quality*, Volumen 30, pp. 418-426.

Bourne, J. & Kerry, B., 2002. *A manual for research on verticillium chlamydosporium, a potential biological control agent for root-knot nematodes.* IOBC;OILB, WPRS/SROP. ed. Germani: Darmastard.

Cabrera-Hidalgo, A. y otros, 2014. Occurrence of *Nacobbus aberrans* in horticultural crops in northwestern Michoacan, Mexico. *Nematropica*, Volumen 44, pp. 107-117.

Castro, L., Flores, L. & Uribe, L., 2011. Efecto de vermicomposta y quitina sobre el control de *Meloidogyne incognita* en tomate a nivel de invernadero. *Agronomia costarricense*, 35(2), pp. 21-32.

Castro, S., 2015. “*Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en Tomate, Chile y Papa*”. Mexico, Curso del INCAPA.

CESAVEG, 2016. Manual de plagas y enfermedades en jitomate.. *Campaña de manejo Fitosanitario de jitomate*, p. 28.

Cid del Prado, V., Cristobal, A. & Evans, K., 1997. Manejo de poblaciones de *Nacobbus aberrans* en el cultivo de tomate (*Lycoersicon esculatum* Mill.). *Nematropica*, Volumen 27, p. 104.

Cohen, E., 2001. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag Sci*, Volumen 57, pp. 946-950.

Cornell University, 2015. *College of Agriculture and life scincies .Department of Animal Science - Plants Poisonous to Livestock..* [En línea] Available at: <http://poisonousplants.ansci.cornell.edu/toxicagents/glucosin.html>. [Último acceso: 11 Junio. 2016].

Cristiobal Alejo , J. y otros, 2006. Epidemiology and integrated control of *Nacobbus aberrans* on tomato in Mexico. *Nematology*, 8(5), pp. 727-732.

Cristobal A.J., y otros, 2001. Sobrevivencia de estadios biologicos *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo.. *Nematropica*, Volumen 31, pp. 227-233..

Davila Aviña, J. E. d. J. y otros, 2011. Effect of Edible Coatings, Storage Time and Maturity Stage on Overall Quality of Tomato Fruits. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, pp. 162-171.

Dominique, B., Laterrot, H., Marchoux, G. & Candresse, T., 2011. En: *Enfermedades del tomate: Identificar, conocer, controlar..* Mexico: Editoriales Mundi-Prensa., p. 679.

DUPONT, 2016. *DUPONT*. [En línea] Available at: <http://www.dupont.es/productos-y-servicios/proteccion-de-cultivos/cultivo-de-hortícolas-de-fruto/productos/vydate-10-l-plagas-del-tomate.html>. [Último acceso: 12 JUNIO 2016].

Esteves a, B. P. b. ., S. P. c. ., N. M. d. & B. K., 2009. Los resultados encontraron que *Pochonia chlamydosporia* puede utilizar diferentes mecanismos osmoregulación para superar tensiones osmóticas y matricial.. *Biocontrol Science and Technology*, 19(2), pp. 185-199.

FAO, 2013. *Departamento de agricultura..* [En línea]. Available at: <http://www.fao.org/docrep/005/Y1806S/y1806s08.htm>. [Último acceso: 9 junio 2016].

Flores-Camacho, R., 2003. Búsqueda y aislamiento de algunos hongos nematofagos para el control de *Nacobbus aberrans* (Thorner, 1985) Thorner y Allen, 1994 en Mexico.. *Tesis para obtener el grado de maestra en ciencias. Colegio de Postgraduados.Campus Montecillo..*

Flores-Camacho, R., Manzanilla-Lopez, R. H., Cid del Prado Vera, I. & Martinez-Garza, A., 2007. Control de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen con *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare.. *Rev. mex. fitopatología*, 25(1), pp. 26-34.

Franco Navarro, F., Cid del Prado Vera, I. & Romero Tejada, M. d. I. L., 2013. Aislamiento y potencial parasítico de un aislamiento nativo de *Pochonia chlamydosporia* en contra de *Nacobbus aberrans* en frijol.. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Volumen 30, pp. 102-114.

Franco-Navarro F., 2002. Incorporación de residuos de col (*Ricinus comunis* L.) para el manejo de *Nacobbus aberrans* y su impacto en la nutrición de tomate.. *Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.*

Gamms, W., 1988. A Contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*.. *Neth JPL.Phat.*, Volumen 94, pp. 123-128.

Hernandez, M. & Hidalgo-Diaz, L., 2008. KlamiC: Bionemática agrícola producido a partir del hongo *P.chlamydosporia* var. *catenulata*.. *Proteccion Vegetal*, 23(2), pp. 131-134.

ICAMEX, 2005. Producción de jitomate en invernadero. *Programa de Difusión.*, pp. 1-39.

Irving, F. & Kerry, B., 1986. Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. II. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. *Nematologica*, Volumen 32, pp. 474-485.

Jaronski, S.T. Commercial development of deuteromycetous fungi of arthropods: a critical appraisal. In: Samson, R.A.; Vlak, J.M.; Peters, R. (Ed.). *Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology*. Wageningen: Society of Invertebrate Pathology, 1986. p.653-656.

Kerry, B., 2001. Exploitation of the Nematophagous Fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp).. En: *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential.* Wallingford: CAB International, pp. 155-168.

Leyva-Mir, S. G., González-Solano, C. M., Rodríguez-Pérez, J. E. & Montalvo-Hernández, D., 2013. Comportamiento de líneas avanzadas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a fitopatógenos en Chapingo, México. *Rev. Chapingo Ser.Hortic*, 19(3), pp. 301-313.

Lopez-LLorca, V. & Hans-Borje, J., 2001. Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuaderno de Biodiversidad.*, Issue 6.

Manzanilla L., R. y otros, 2002. El género *Nacobbus* Thorne y Allen, 1994 (Nematoda: Pratylenchidae): Sistemática, distribución, biología y manejo.. *Nematropica*, Volumen 32, pp. 49-227.

Manzanilla-Lopez, R. H. y otros, 2013. *Pochonia chlamydosporia*: Advance and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endoparasitic nematodes.. *Journal of Nematology*, 45(1), pp. 1-7.

Manzanilla-Lopez, R. H. & Marbán-Mendoza, N., 2012. *Practical Plant Nematology*. 1ra ed. Mexico: Biblioteca básica de agricultura..

Marbán, M. N., 1985. Fitonematología avanzada I. En: Mexico: Colegio de Postgraduados, p. 345p..

Majeti N. V. Ravi Kumar., 2000. A review of chitin and chitosan applications.. *React Funct Polym* , Volumen 46, pp. 1-27.

Montes-Belmont, R., 2000. *Nematologia Vegetal en Mexico. Investigacion documental.* Cd. Obregón, Sonora, Mexico., s.n.

Morgan, J. & Rodriguez, K., 1985. Phytonematode pathology: fungal modes of action a perspective.. *Nematropica*, Volumen 15, pp. 107-114.

Nonaka, K., Omura, S., Masuma, R. & Kaifuchi, S., 2013. Three new *Pochonia* taxa (Clavicipitaceae) from soils in Japan. *Mycologia*, 105(5), pp. 1202-1218.

Perez Rodriguez, I., 2008. *Control integrado de Nacobbus aberrans en chile (Capsicum annu L.) bajo condiciones de invernadero y campo.* Mexico: Colegio de postgraduados..

Perez, R., 2004. Eficiencia de cinco aislamientos del hongo de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen 1944, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Tesis de Licenciatura. ITA. Tlaxcala.*, p. 64.

Piedra Naranjo, R., 2008. Manejo biológico de nematodos fitoparasitos con hongos y bacterias. *Tecnología en Marcha*, Volumen 21, pp. 123-132.

Ramirez R., S. y otros, 2009. Plagas y enfermedades del jitomate cultivado en invernaderos y bioespacios del Estado de Morelos.. *INIFAP. Folleto Técnico.*, Volumen 37, p. 79.

Ramirez, M., Rodriguez, A. & Peniche, D., 2010. La quitina y sus derivados, biopolímeros con potencialidades de aplicaciones agrícolas.. *Biotecnología aplicada.*, Volumen 4.

Rodriguez-Kabana, R., Morgan-Jones, G. & Gintis, B., 1984. Effect of chitin amendments to soil on Heterodera. *Nematropica*, Volumen 14, pp. 10-25.

SAGARPA, 2013. *Estudio de oportunidades de Mercado e inteligencia comercial y estudio de logística e jitomate.* [En línea]: Available at: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios-promercado/TOMATE.pdf>. [Último acceso: 26 septiembre 2015].

SAGARPA, 2015. [En línea]. Available at: http://2006-2012.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/potencialproductivo/especificos/problemas_fitosanitarios.pdf. [Último acceso: 19 Marzo 2016].

Sher, S., 1970. Revision of the genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Tylenhoidea).. *Journal of Nematology* , Volumen 2, pp. 228-235.

SIAP, 2014. SIAP, 2015.

Syngenta, 2016. [En línea]: Available at: <http://www3.syngenta.com/country/es/sp/cultivos/tomate/enfermedades-tomate/Paginas/mildiu.aspx>. [Último acceso: 22 agosto 2016].

Syngenta, 2016. *Catálogo de tomate*, Madrid: s.n.

Synowiecki J, A.-K. N., 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives.. *Crit Rev Food Sci*, 43(2), pp. 145-171.

Tharanathan RN, K. F., 2003. Chitin - The undisputed biomolecule of great potential.. *Crit Rev Food Sci* , 43(1), pp. 61-87.

Tikhnov, V., Lopez-Llorca, L., Salinas, J. & Jasson, H., 2002. Purificación y caracterización de las quitinasas de el hongo nematofago *Verticillium chlamyosporium* y *V.suchlasporium*.. *Genet Biol.*, Volumen 35, pp. 7-78.

Velasco- Hernandez, E., Nieto Angel, R. & Navarro Lopez, E., 2011. *Cultivo de tomate e hidroponia e invernadero*. Tercera ed. Mexico: Biblioteca basica de agricultura.

Velasco Hernandez, E., Nieto Angel, R. & Navarro Lopez, E. R., 2011. *Cultivo del tomate en hidroponia e invernadero*. Tercera Edicion ed. Mexico: Biblioteca Basica de Agricultura.

Velasco, A., 2014. Actividad de doce especies vegetales del estado de Oaxaca contra *N. aberrans*.. *Universidad del Mar.Campus Puerto Angel.Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Ambientales.*, p. 89.

Velasquez, C., 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamerica.. *Revista UDO Agricola*, 8(1), pp. 1-22.

Villacide, J.M. y J.C. Corley. 2012. Serie técnica: Manejo Integrado de Plagas Forestales. Cambio Rural. Laboratorio de Ecología de Insectos. INTA EEA Bariloche

Cuadernillo n° 15 - Febrero de 2012

Weller, D., 1988. Control biológico de patógenos de plantas transmitida por bacterias en la rizosfera de suelo.. *Rev.Phytophathology*, Volumen 26, pp. 379-407.

Yañez-Juarez, G. y otros, 2001. Management of Wilting (*Phytophthora capsici* Leo.) Root Galling (*Nacobbus aberrans* Thorne and Allen), and Virosis in Pepper (*Capsicum annuum* L.).. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Volumen 19, pp. 40-48.

Zaki, A. & Mahmood, I., 1996. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A Review. *Bioresource Technology*, Volumen 58, pp. 229-239.

Zavaleta-Mejia, E. & R.M., I., 1998. Efecto de la incorporación de residuos de crucíferas sobre fitopatógenos del suelo. I. Efecto de la incorporación de col (*Brassica oleracea* L.) sobre *Meloidogyne incognita* (Kofoid y Whitw). *Revista Mexicana de Fitopatología*, Volumen 6, pp. 166-177.