



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**

**PARASITISMO *IN VITRO* DE CINCO AISLAMIENTOS MEXICANOS DE  
*Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare, Evans & Gams SOBRE  
*Nacobbus aberrans* Y ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA SU  
PRODUCCIÓN MASIVA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO:**

**INGENIERA AGRICOLA**

**P R E S E N T A:**

**ANGELA DOROTEO MENDOZA**

**ASESORES:**

**ASESOR: M.C. ALFONSINA JUDITH HERNÁNDEZ  
ASESOR EXTERNO: M.C. FRANCISCO FRANCO NAVARRO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	v
<b>RESUMEN GENERAL</b> .....	vi
<b>1 INTRODUCCION</b> .....	1
1.1 OBJETIVOS GENERALES.....	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.3 HIPÓTESIS.....	3
<b>2 REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
2.1 EL NEMATODO FALSO NODULADOR, <i>Nacobbus aberrans</i> .....	4
2.1.1 Diagnósis y sintomatología.....	4
2.1.2 Ciclo de vida.....	5
2.1.3 Distribución y rango de hospedantes.....	6
2.1.4 Importancia económica.....	7
2.1.5 Control del nematodo falso nodulador.....	8
2.2 ASPECTOS GENERALES DE <i>Pochonia chlamydosporia</i> .....	10
2.2.1 Generalidades.....	10
2.2.2 Ecología y biología.....	10
2.2.2 <i>Pochonia chlamydosporia</i> : Una alternativa al control de nematodos fitopatógenos.....	13
2.2.3 Producción masiva de <i>Pochonia chlamydosporia</i> en sustratos sólidos.....	16
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
3.1 PRUEBA DE PARASITISMO DE HUEVOS.....	18
3.1.1 Preparación del inóculo de <i>P. chlamydosporia</i> .....	18
3.1.2 Extracción de huevos de <i>N. aberrans</i> .....	19
3.1.3 Establecimiento y evaluación de los experimentos.....	19
3.2 PRODUCCIÓN MASIVA DEL HONGO EN DIFERENTES SUSTRATOS.....	20
3.2.1 Establecimiento y evaluación del experimento.....	20
3.3 Análisis estadístico.....	20

<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	21
4.1	PRUEBA DE PARASITISMO DE HUEVOS.....	21
4.2	PRODUCCIÓN MASIVA DEL HONGO EN DIFERENTES SUSTRATOS.....	25
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	32
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	37
<b>7</b>	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	38
	<b>APÉNDICE</b> .....	41

## INDICE DE CUADROS

CUADRO	DESCRIPCIÓN	PÁG.
1	Análisis de varianza de los tratamientos en los que se inocularon diferentes aislamientos de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> a partir de arroz colonizado.....	22
2	Porcentaje de parasitismo de diferentes aislamientos de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> a partir de arroz colonizado.....	22
3	Análisis de varianza de los tratamientos donde se inocularon diferentes aislamientos de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> a partir de crecimientos en PA de 21 días.....	23
4	Porcentaje de parasitismo de diferentes aislamientos de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> , a partir de crecimientos en PA de 21 días.....	24
5	Análisis de varianza de los diferentes tratamientos aplicados para la producción masiva de un aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> (15 días posteriores a la inoculación).....	26
6	Análisis de varianza de los diferentes tratamientos aplicados para la producción masiva de un aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> (21 días posteriores a la inoculación).....	27
7	Análisis de varianza de los diferentes tratamientos aplicados para la producción masiva de un aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> (28 días posteriores a la inoculación).....	27
8	Producción masiva de un aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> en diferentes sustratos de crecimiento (15 días posteriores a la inoculación).....	28
9	Producción masiva de un aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> en diferentes sustratos de crecimiento (21 días posteriores a la inoculación).....	28
10	Producción masiva de un aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> en diferentes sustratos de crecimiento (28 días	

	posteriores a la incubación).....	29
11	Suspensión de clamidosporas aplicada para cada aislamiento en el primer experimento de parasitismo <i>in vitro</i> .....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁG.
1	Huevo de <i>N. aberrans</i> parasitado por un aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> luego de las pruebas de parasitismo <i>in vitro</i> .....	21
2	Parasitismo de los diferentes aislamientos probados de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> sobre huevos de dos poblaciones de <i>N. aberrans</i> (Fuente de inóculo: arroz colonizado).....	23
3	Parasitismo de los diferentes aislamientos probados de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> sobre huevecillos de dos poblaciones de <i>N. aberrans</i> (Fuente de inóculo: crecimiento de 21 días).....	25
4	Dinámica de producción de clamidosporas por un aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> , a diferentes fechas de evaluación y utilizando diferentes sustratos de crecimiento.....	26
5	Número de clamidosporas g <sup>-1</sup> de sustrato, de un aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> a diferentes fechas de evaluación y utilizando diferentes sustratos de crecimiento.....	30
6	Porcentaje de germinación de clamidosporas de un aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> , a diferentes fechas de evaluación y utilizando diferentes sustratos de crecimiento.....	31
7	Numero de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) g <sup>-1</sup> de sustrato, de un aislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> , a diferentes fechas de evaluación y utilizando diferentes sustratos de crecimiento.....	31
8	Clamidosporas de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> .....	44
9	Germinación de clamidospora de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> .....	45
10	Unidades Formadoras de Colonias de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> .....	46

## RESUMEN GENERAL

Se realizaron pruebas de parasitismo *in vitro*, en huevos de dos poblaciones de *Nacobbus aberrans* (Montecillo, Estado de México y Tecamachalco, Puebla), utilizando cinco aislamientos del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (etiquetados como SC1, SMB3, SMB3A, SM4 y MHCH), partiendo de dos fuentes de inóculo del hongo (crecimientos de 21 días de edad en placas de Papa-Agar –PA- y arroz colonizado previamente por el hongo). Al utilizar crecimientos a partir de placas de PA, se obtuvieron diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.01$ ) entre aislamientos, sobre en ambas poblaciones del nematodo. Los aislamientos que presentaron mayor porcentaje de parasitismo fueron SC1, SMB3 y SMB3A con 89.0, 86.0 y 77.2%, respectivamente, sobre la población Montecillo, mientras que para la población Tecamachalco el parasitismo fue de 83.4, 78.2 y 79.9% por parte de los aislamientos SC1, SMB3 y SMB3A, respectivamente. Cuando se utilizó arroz colonizado por cada aislamiento, como fuente de inóculo, también se obtuvieron diferencias significativas para ambas poblaciones; los mejores aislamientos contra la población Montecillo fueron SMB3, SMB3A y SC1 con porcentajes entre el 87.0, 79.0 y 77.0%, mientras que en el caso de la población Tecamachalco, los aislamientos más exitosos fueron SMB3, SC1 y SMB3A con 81.2, 79.4 y 72 %, respectivamente.

En la segunda fase de este trabajo, bajo un método estandarizado de producción masiva de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, se probaron dos sustratos para el crecimiento del hongo: arroz entero (sustrato convencional), y maíz quebrado (sustrato alternativo), llevando al cabo dos fases de producción (proceso bifásico), una líquida y otra sólida, y combinando en ambas fases el tipo de sustrato (fase líquida con arroz y fase sólida con arroz, fase líquida con arroz y fase sólida con maíz quebrado, y fase líquida con maíz quebrado y fase sólida con maíz quebrado), todo esto evaluando tres fechas de incubación: 15, 21 y 28 días posteriores a la inoculación del hongo (dpi). En esta fase de trabajo sólo se utilizó el aislamiento etiquetado como SC1 y se evaluaron tres variables de calidad del producto: concentración de clamidosporas, porcentaje de germinación de clamidosporas y número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de sustrato. En las tres fechas de evaluación se obtuvieron diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.01$ ). A los 15 dpi, se obtuvo una mayor concentración de clamidosporas y el número más elevado de UFC utilizando arroz líquido y arroz sólido ( $7.7 \times 10^6$  y  $1.5 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup>

de sustrato, respectivamente), aunque el porcentaje de germinación de clamidosporas fue mayor al utilizar arroz líquido y maíz quebrado sólido. A los 21 dpi, la mayor concentración de clamidosporas se obtuvo con maíz quebrado líquido y maíz quebrado sólido, con  $13.1 \times 10^6$  clamidosporas  $\text{gr}^{-1}$  de sustrato, no así para las otras dos variables; los mayores resultados se obtuvieron con la combinación arroz líquido y maíz quebrado sólido (80% de clamidosporas germinadas y  $7.3 \times 10^7$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de sustrato). Finalmente, a los 28 dpi, con la combinación arroz líquido + maíz quebrado sólido se obtuvo la mayor concentración de clamidosporas ( $8.1 \times 10^6$  clamidosporas  $\text{gr}^{-1}$  de sustrato), mientras que con maíz quebrado líquido y maíz quebrado sólido, tanto el porcentaje de germinación de clamidosporas (82.8%) como el número de UFC ( $7.5 \times 10^7$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de sustrato) fueron mayores. De manera general, el maíz quebrado resultó ser un sustrato alternativo para la producción masiva de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, ya que además de ser más barato que el convencional, permitió obtener parámetros de calidad del producto mayores a los que se alcanzan al utilizar arroz entero como sustrato de crecimiento.

## 1 INTRODUCCIÓN

El interés por las enfermedades provocadas por nematodos en distintos cultivos agrícolas, ha aumentado a consecuencia de las pérdidas económicas que éstas producen; tal es el caso del nematodo falso nodulador (*Nacobbus aberrans*), el cual causa pérdidas importantes en cultivos como el chile (*Capsicum annum* L), jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Flores, 2003). En la República Mexicana, se ha detectado a *Nacobbus aberrans* en 10 entidades (Cid del Prado *et al.*, 1996), siendo el jitomate el cultivo más afectado y en el cual induce la enfermedad conocida como “jicamilla”, debido al tipo de agallas que éste produce en las raíces de las plantas. El nematodo falso nodulador es sin duda un problema en los campos agrícolas, ya que donde está presente afecta no sólo a plantas cultivadas sino también parasita a plantas arvenses. Además, posee un amplio rango de hospedantes, sobrevive aún en ausencia de plantas y tiene una alta capacidad reproductiva, convirtiéndose así en una plaga difícil de controlar. De manera general, existen diversos métodos de control de nematodos fitopatógenos, aunque el más utilizado es el químico. A pesar de que el costo por las aplicaciones de productos químicos es muy elevado, se realiza de manera constante. Un agravante más de estos productos es el hecho de que en la actualidad existen restricciones ambientales que han provocado la salida de varios productos con propiedades nematocidas, entre los que resalta el bromuro de metilo (Flores, 2003). Ante estas circunstancias, desde hace varios años ha comenzado la búsqueda de nuevas formas de control, tales como la utilización de mejoradores de suelo o la utilización de enemigos naturales que regulen de manera permanente el desarrollo de nematodos fitopatógenos en el suelo. Entre los microorganismos más estudiados y que poseen la capacidad de regular poblaciones de nematodos fitopatógenos en suelo, se encuentran *Arthrobotrys spp.* Corda y *Paecilomyces spp.* Bainier. Hoy en día se sabe que otro hongo con potencial para el control biológico de nematodos, principalmente agalladores (*Meloidogyne spp.*) y el nematodo falso nodulador (*Nacobbus aberrans*) es *Pochonia chlamydosporia*, un parásito facultativo que se presenta naturalmente en suelos supresivos y que es considerado en la actualidad como uno de los agentes más prometedores en el control biológico

de nematodos fitopatógenos (Kerry, 1995). En México se han encontrado algunos aislamientos nativos de una de las dos especies de *P. chlamydosporia* (*P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*), 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); sin embargo, se requiere realizar pruebas que permitan conocer el potencial parasítico de dichos aislamientos sobre el nematodo, con el fin de incorporarlos dentro de un esquema de control integrado de este nematodo en el mediano plazo. Otro aspecto importante a considerar en el estudio y selección de aislamientos de *P. chlamydosporia* es el conocimiento de las condiciones en que deben ser aplicados y el mejor vehículo para lograr su establecimiento en el sistema en el que se desea que actúe, ello basado en su capacidad para producir masivamente el inóculo necesario a aplicar en el suelo. Con base en esto, es importante mencionar que sólo los aislamientos que puedan ser producidos masivamente en un sustrato sólido, son los que resultan viables para ser aplicados 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. Ante la necesidad de estudiar el potencial de los aislamientos mexicanos de *P. chlamydosporia* antes mencionados, y así determinar su posible incorporación al control integrado de *N. aberrans*, se llevó al cabo la presente investigación.

## 1.1 OBJETIVO GENERALES

- Establecer la eficiencia parasítica de cinco cepas mexicanas de *P. c. chlamydosporia* sobre *Nacobbus aberrans* bajo condiciones *in vitro*.
- Estandarizar un método de producción masiva de *P. chlamydosporia* utilizando un sustrato más económico y manejable que el usado de manera cotidiana.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Probar dos fuentes de inóculo del hongo (crecimientos de 21 días de edad en placas de papa-agar y arroz colonizado por el hongo), sobre huevos de dos poblaciones de *N. aberrans*.
- Cuantificar el número de huevos de *N. aberrans* parasitados por el hongo.
- Comparar el potencial productivo del maíz quebrado como sustrato de crecimiento, respecto al utilizado cotidianamente (arroz entero).
- Evaluar la cantidad y calidad del inóculo producido masivamente, al utilizar arroz quebrado como sustrato de crecimiento.

## 1.3 HIPOTESIS

- Al menos uno de los aislamientos mexicanos probados será más eficaz en el parasitismo de huevos del nematodo, independientemente de la fuente de inóculo empleada.
- El maíz quebrado es un sustrato para el crecimiento del hongo, de igual o mejor calidad que el utilizado convencionalmente (arroz quebrado).

## 2 REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 EL NEMATODO FALSO NODULADOR, *Nacobbus aberrans*

#### 2.1.1 Diagnósis y sintomatología

*Nacobbus aberrans* es una especie que presenta un marcado dimorfismo sexual entre los adultos. Por un lado las hembras inmaduras son vermiformes, de 0.6-1 mm de longitud, con cutícula anulada y campos laterales con cuatro incisuras irregularmente aereoladas. Su área labial es redondeada, fuertemente esclerosada; estilete robusto de 21-25  $\mu\text{m}$  de longitud, con nódulos basales redondeados; esófago con bulbo medio prominente y válvulas conspicuas; las glándulas esofágicas son alargadas y sobrepuestas dorsalmente al intestino. La vulva es posterior, entre el 90-95% del cuerpo; su cola es corta, redondeada. La hembra inmadura se caracteriza por ser migratoria en suelo y raíces. Por su parte las hembras maduras son saculares, con bulbo medio redondo, válvulas conspicuas y glándulas esofágicas sobrepuestas dorsalmente al intestino. Su región cefálica está esclerosada y es hemisférica. Su región posterior es ensanchada; la vulva es subterminal. La cola es corta, con terminación roma, bífida o irregular. Este es el estado parásito sedentario en la raíz, y junto con las hembras inmaduras inducen la formación de agallas (Cid del Prado 1985; Manzanilla *et al.*, 2002). Los machos son vermiformes, con esclerotización cefálica bien desarrollada y estilete de 20-35  $\mu\text{m}$  de longitud. El esófago presenta glándulas esofágicas largas y sobrepuestas dorsalmente. El cuerpo es cilíndrico; los fasmidios se ubican entre la cola y las espículas, las cuales están ligeramente curvadas hacia el vientre y miden de 25-35  $\mu\text{m}$  de longitud. El testículo es simple, expandido hacia la pared del cuerpo; cola totalmente envuelta por una bursa de tipo terminal. Los machos son migratorios en suelo y raíces (Franklin, 1959; Clark, 1967; Cid del Prado, 1985; Luc *et. al*, 1990; Siddiqi, 2000 citado por Manzanilla *et al.*, 2002).

Respecto a los estadios juveniles, los del segundo estadio (J2) son vermiformes, similares a las hembras inmaduras aunque de menor tamaño y

sin los caracteres sexuales aún desarrollados; este estadio es migratorio en raíces y suelo . Por su parte los juveniles del tercer estadio (J3), son de tamaño mayor al de los J2 y con primordios genitales que corresponden a las gónadas en los adultos. En cuanto al juvenil del cuarto estadio (J4), éste presenta un desarrollo de las gónadas suficiente como para determinar el futuro sexo del nematodo, ello dependiendo de la información genética que lo determinará. Tanto los J3 como los J4 son menos activos en comparación con los J2 o las hembras inmaduras, y se les encuentra sobre todo en los tejidos de la raíz. Los J3 y J4 adoptan una típica forma curvada o de letra “C” al ser fijados (Cid del Prado, 1985; Manzanilla *et al.*, 2002).

Los síntomas que el nematodo falso nodulador ocasiona en follaje consisten en la presencia de una coloración amarillenta de las hojas, bordes enroscados, frutos de tamaño pequeño y marchitamiento general de la planta si se acompaña de una deficiencia de humedad en horas de insolación; sin embargo, el síntoma más característico se manifiesta en las raíces, donde se observa el daño del nematodo a manera de agallas, motivo por el cual recibe el nombre de “nematodo falso nodulador”, ya que estas son parecidas a las producidas por *Meloidogyne* spp., los nematodos típicamente agalladores. Estas agallas por lo general son pequeñas, de forma esférica, separadas a manera de “rosario”, las cuales pueden estar vacías o contener hasta cinco hembras en chile (*Capsicum annuum* L) y jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) (Cristóbal *et al.*, 2001).

## **2. 1. 2 Ciclo de vida**

Considerado que las hembras inmaduras de *N. aberrans* se establecen dentro de las raíces e inducen la formación de agallas, las cuales maduran sexualmente dentro de la raíz, siendo muy probable que ahí ocurra la fecundación con los machos, las hembras empiezan a secretar a través del ano una cantidad considerable de material gelatinoso dentro del cual se van depositando cientos de huevos en diferentes fases de desarrollo; éstos son ovales, con el corion o cubierta de aspecto liso. El primer estadio juvenil se presenta dentro del huevo, el cual muda al segundo estadio juvenil que es el

que eclosiona. El ciclo de vida va de los 25 a los 50 días y puede modificarse en función de las razas específicas del nematodo, el tipo de hospedante y las condiciones ambientales (Cid del Prado y Manzanilla, 1992).

El juvenil que emerge del huevo es considerado como primer estadio infectivo, es decir, que es el estadio que penetra la raíz y se mueve intracelularmente en el interior de la corteza de las raíces, provocando necrosis en la pared celular. La muda para el tercer estadio ocurre generalmente dentro de la raíz, aunque existen reportes que señalan que puede ocurrir en el suelo (Clark, 1967 citado por Manzanilla *et al.*, 2002). Los juveniles del tercer estadio se caracterizan por incrementar su tamaño y grosor, además de que los sexos pueden diferenciarse por su longitud y posición de la gónada. En este estadio juvenil, el nematodo es capaz de mantener su movilidad y actividad endoparasítica migratoria, así como la capacidad de abandonar la raíz. En el cuarto estadio larvario se manifiestan la separación sexual; en el caso de las hembras son activas e infectivas, ya que se mueven dentro de la corteza e inclusive pueden salir de la raíz. Después del establecimiento de las hembras en la raíz, inicia la formación de un sitio especializado de alimentación llamado sincitium (masa citoplasmática multinucleada) e incrementa paulatinamente su grosor hasta tener una forma de saco, en el que empiezan a desarrollarse los huevos; en este momento empiezan a producirse el material gelatinoso donde se van a secretar los huevos (Cid del Prado *et al.*, 1996).

La temperatura es un factor de regulación muy importante en el desarrollo y la sobrevivencia del nematodo falso nodulador; por ejemplo, en Argentina sus temperaturas óptimas van de los 22° a los 24°C (Costilla, 1990, citado por Manzanilla *et al.*, 2002; Cid del Prado 1985), mientras que en México se le ha reportado en lugares como Tecamachalco, Puebla, cuyas temperaturas mínimas oscilan alrededor de los 3.5°C y las máximas alrededor de los 29.5°C (Zamudio, 1987).

### **2. 1. 3 Distribución y rango de hospedantes**

Respecto a la distribución del nematodo falso nodulador a nivel del mundial, se sabe que *N. aberrans* esta presente en varios países entre los que resalta: Argentina, Bolivia, Chile, Perú, Ecuador, Estados Unidos, Inglaterra, India, Holanda, Rusia y México (Cid del Prado *et al.*, 1996). En territorio nacional, el nematodo ha sido reportado en estados como Oaxaca, Hidalgo, Puebla, Estado de México, San Luis Potosí, Guanajuato, Tlaxcala, Coahuila y Zacatecas (Cid del Prado y García, 1991).

El rango de hospedantes de *Nacobbus aberrans* es muy amplio e incluye al menos 69 especies de plantas cultivadas, pertenecientes a 17 familias botánicas dentro de las que se encuentran: Amaranthaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Poaceae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Leguminosae, Fabaceae, Solanaceae, Umbeliferae y Zygophyllaceae. En América los cultivos comerciales que son hospedantes del nematodo falso nodulador se encuentra la papa (en Sudamérica), remolacha (Nebraska y el Pacífico Noroeste de los EEUU), y tomate (México y las tierras subtropicales de la Argentina y Ecuador), otros cultivos hospedantes son por ejemplo el haba, la zanahoria, el cardo, la berenjena, la pimienta, la calabaza, el tabaco y el chile (Cid del Prado *et al.*, 1996). En México, un gran número de plantas son parasitadas por este nematodo, destacando los cultivos de jitomate (*Lycopersicon esculentum*), chile (*Capsicum annum L*), frijol (*Phaseolus vulgaris L*), acelga (*Beta vulgaris*), espinaca (*Spinacea oleraceae L*), calabacita (*Cucurbita pepo L*) y amaranto (*Amaranthus hypocondriachus*); también existen arvenses hospedantes del nematodo, como lo es el caso de la verdolaga (*Portulaca oleraceae*) y el quelite cenizo (*Chenopodium album*) (Silva, 1989; Toledo, 1990; Cristóbal, 2001; Flores 2003).

#### **2.1.4 Importancia económica**

*Nacobbus aberrans* es un nematodo que se adapta a condiciones climáticas que pueden ir desde templadas a muy frías, ya que se le ha encontrado desde los 500 hasta los 4500 msnm (Zamudio 1987). Este nematodo es endémico de América, aunque se ha reportado en Europa y en países tan lejanos como China e India. En México, *N. aberrans* fue reportada por primera vez en raíces

de Chile en 1967 por Bruner, registrándose posteriormente como patógeno de otros cultivos de importancia económica tales como jitomate, calabacita, frijol, espinaca, acelga, amaranto y remolacha (Cid del Prado 1985; Cristóbal 2001; Manzanilla, *et al.*, 2002; Flores 2003). El impacto que puede tener este nematodo en hortalizas se ha documentado principalmente en Chile, frijol y jitomate, sobresaliendo éste último en cuanto al número de estudios realizados al respecto. En Hidalgo por ejemplo, se atribuye el abandono del cultivo de jitomate a la presencia de este nematodo, mientras que en Tecamachalco, Puebla, las pérdidas a nivel campo pueden oscilar entre el 50 y el 70% debidas a éste (Cristóbal *et al.*, 2001). El mismo Cristóbal *et al.* (2001), trabajando con tres condiciones de manejo diferentes en un predio infestado con *N. aberrans*, estimó las pérdidas de producción de tomate cv. Río Grande en un 12% bajo un control integrado; de un 29% haciendo uso de las prácticas agronómicas regionales y de un 83% cuando no se realizó ningún control.

### **2.1.5 Control del nematodo falso nodulador**

Se han probado diferentes estrategias para el control de *N. aberrans*, incluyendo algunas de tipo químico, cultural y genético; sin embargo, el que ha recibido mayor atención es el basado en la aplicación de productos químicos, debido a que han dado mejores resultados y sus efectos suelen ser más rápidos. Esta estrategia es de costo elevado, requiere de aplicaciones continuas, y sólo se justifica su uso en cultivos redituables, motivo por el cual, en los últimos años se ha venido restringiendo el uso de productos químicos a causa de su impacto nocivo al ambiente y la generación de numerosos problemas de salud pública asociados a su uso indiscriminado e incorrecto. Estudios realizados acerca de las diferentes interacciones que establecen los nematodos con otros organismos en el suelo, indican que existen especies antagonistas o reguladoras de estos, lo que ha llevado a explorar esta rama del control biológico, el control microbiológico, ello con el fin de incorporarlo como un elemento más en el manejo integrado de nematodos fitopatógenos. Entre los diversos organismos que pueden ser antagonistas de nematodos se

encuentran: las bacterias, los nematodos, los protozoos, los arácnidos y los hongos. Los dos grupos más estudiados respecto al control de nematodos fitopatógenos han sido las bacterias y los hongos.

Dentro del grupo de las bacterias, se conoce a *Pasteuria penetrans*, el cual es un parásito obligado y muy común en especies de *Melodogyne*, así como otros generos de importancia económica (*Pratylenchus*, *Xiphinema*, *Helicotylenchus*, etc.). Esta bacteria se encuentra distribuida a nivel mundial (Rodríguez-Kabana, 1991). Respecto a los hongos utilizados como biocontroladores de nematodos, se conocen especies dentro de los quitridiomicetos (*Catenaria spp.*), los oomicetos (*Myzocytiium spp.*, *Haptoglosa spp.*), los anamorfos (*Harposporium spp.* y *Cephalosporium spp.*), y algunos basidiomicetos (*Nematoctonus spp.*). Las especies que se han reportado con un futuro promisorio para el control de nematodos agalladores y formadores de quistes, pertenecen a los géneros *Paecilomyces* Bainier y *Pochonia* (= *Verticillium*) Ness.

Los hongos que pueden utilizarse para biocontrol de nematodos se agrupan de la siguiente manera: 1) hongos atrapadores de nematodos, y 2) hongos parásitos de huevos, quistes o endoparásitos de juveniles y adultos. Los que pertenecen al primer grupo se caracterizan por el hecho de que atrapan a sus presas por medio de estructuras especializadas como hifas adhesivas, ramificaciones adhesivas del micelio, anillos constrictores y no constrictores (Barron, 1977, citado por Flores, 2003; Deacon, 1997 citado por Rodríguez-Kabana, 1991); el segundo grupo lo constituyen especies que dependen de los nematodos como principal fuente alimenticia, y su densidad poblacional en el suelo depende en gran medida de la densidad poblacional de los nematodos . De acuerdo con (Barron 1977, citado por Flores, 2003) los hongos endoparásitos no desarrollan micelio en forma extensiva fuera del organismo huésped, presentan estados de resistencia cuya función es la diseminación y la sobrevivencia bajo condiciones adversas, y en algunos casos se presentan conidias adhesivas que facilitan el contacto y la interacción hongo-nematodo (*Meria spp.*, *Cephalosporium spp* y *Pochonia spp.*).

Kerry (1997), menciona que varias de las investigaciones sobre control microbiológico de nematodos se han enfocado principalmente hacia hongos con la capacidad de formar estructuras especializadas para la captura de nematodos (mediante anillos constrictores, nódulos adhesivos o redes de micelio); sin embargo, los hongos que parasitan estados juveniles y/o huevos (por ejemplo *Pochonia chlamydosporia*), presentan características biológicas que en un momento dado permitirían aceptarlos como agentes comerciales de control biológico de nematodos fitopatógenos. Cabe hacer mención de que en México el control biológico de nematodos, utilizando principalmente hongos nematófagos, se ha estudiado muy poco; sin embargo, se han realizado trabajos de exploración con diferentes hongos habitantes del suelo con potencial para ser usados como agentes de control alternativos; tal es el caso de *Arthrobotrys oligospora* Fres y *A. conodites* Drechsler, ambos aislados de muestras de suelo de nuestro país (Lappe y Ulloa, 1982, citado por Flores, 2003). Respecto al empleo específico de una o más especies de *Pochonia* en nuestro país, el primer trabajo realizado fue el de Flores (2003), quien no sólo hizo una exploración en varios suelos dentro del territorio nacional con el fin de detectar especies nematófagas nativas, sino que además probó la eficiencia parasítica y la capacidad de colonización de raíces de las especies de *Pochonia* aisladas. A partir de este estudio, el cual fue la punta de lanza de posteriores experimentos, se ha venido generando información cada vez más completa de esos primeros aislamientos y de nuevos aislamientos colectados en varias partes de la República Mexicana,

## **2. 2 ASPECTOS GENERALES DE *Pochonia chlamydosporia***

### **2. 1. 1 Generalidades**

*Pochonia chlamydosporia* es un hongo parásito facultativo de huevos de algunos nematodos fitopatógenos, el cual ha sido asociado a suelos supresivos y con un elevado potencial como agente de control natural de nematodos agalladores y de quistes. Este hongo se encuentra distribuido a lo largo del mundo; los diferentes aislamientos reportados de este hongo han sido

extraídos de huevos de nematodos agalladores y de nematodos formadores de quistes, de suelos infestados con estos nematodos, y de plantas parasitadas por estos grupos de patógenos.

El género *Verticillium*, al cual perteneció durante mucho tiempo *Pochonia*, es muy heterogéneo, ya que se constituye de organismos con hábitos de vida saprofitos, fitófagos, entomófagos y nematófagos; y algunas especies que se alimentan de rotíferos e inclusive de otros hongos. Zare *et al.* (2000), realizaron un estudio minucioso para reagrupar a todos los organismos ubicados en este género con criterios más naturales. Dicho estudio consistió en el análisis de cadenas cortas y largas del ADN, derivándose de ello la definición de cuatro agrupaciones o clados: uno constituido por especies de hábitos fitoparásitos y saprofitos, con la capacidad de formar conidióforos erectos; otro grupo compuesto por especies formadoras de colonias de color claro y apariencia algodonosa, sin presencia de clamidosporas y de hábitos entomófagos y fungícolas; un tercer grupo definido fue el constituido por hongos de hábito saprófito y conidias adhesivas, con capacidad de endoparasitar nematodos; finalmente, el cuarto grupo fue definido por organismos saprófitos capaces de colonizar huevos y quistes de nematodos. Derivado de este estudio, Gams y Zare (2001), propusieron nuevos géneros y retomaron otros que ya habían caído en desuso, entre ellos *Pochonia*, un género conformado por parásitos de huevos y quistes de nematodos, con capacidad para formar clamidosporas típicas, de pared engrosada.

### **2. 1. 2 Ecología y biología**

Las colonias de *Pochonia* tienen un crecimiento que alcanza los 15-40 cm de diámetro en 10 días. Los conidióforos son generalmente postrados y poco diferenciados del micelio; las conidias se agrupan en cabezuelas o cadenas, subglobosas a elipsoidales, isodiamétricas o bien falcadas; producen dictioclamidosporas en el micelio aéreo. La especie *Pochonia chlamydosporia* se caracteriza por la presencia de colonias que alcanzan de 20-38 mm de diámetro en 10 días, siendo de color blanco y que posteriormente se torna amarillento debido a la producción de clamidosporas. Los conidióforos son

postrados y portan de 2 a 3 fiálides por nódulo en verticilo; a veces pueden ser sencillos. Las conidias son hialinas o de color brillante, básicamente unicelulares, las cuales crecen en cabezuelas recubiertas de una sustancia adhesiva. Sus clamidosporas son muy típicas (Domsch y Gams, 1980; Zare, Gams y Evans, 2001).

*P. chlamydosporia* es capaz de colonizar la rizósfera de las plantas sin provocar lesiones; este fenómeno permite prolongar la vida del hongo en el suelo, facilita el parasitismo de nematodos agalladores y formadores de quistes, además de que no afecta el desarrollo de las plantas. Su establecimiento se facilita cuando el hongo se adiciona al suelo en forma de clamidosporas (De Leij & Kerry, 1991; Bourne *et al.*, 1994). El hongo forma redes de hifas con órganos especializados que entran en contacto con el corion de los huevos y así se lleve a cabo la penetración mediante la desintegración de la capa vitelina del corion a consecuencia de la disolución parcial de quitina y lípidos (Kerry, 1997).

Aunque la interacción nematodos agalladores-*P. chlamydosporia*-planta hospedante se ha estudiado de manera extensa en los últimos años, dicha relación es compleja y difícil de cuantificar, ello debido a las dificultades que implica establecer con exactitud la abundancia del hongo en la planta hospedante. Por ejemplo, cuando una planta es muy susceptible al nematodo, esta condición puede influenciar en el número de nematodos que invaden las raíces, ya que las hembras producirán una mayor cantidad de masas de huevos con una cantidad considerable de huevos cada una; bajo estas circunstancias, la cantidad de nematodos influye directamente en la cantidad de hongo que puede parasitar las masas de huevos y en consecuencia esto se reflejará en una mayor o menor cantidad de hongo asociado a las raíces donde el nematodo está habitando. Por otro lado, la planta tiene efectos directos e indirectos en el crecimiento del hongo a nivel de la rizosfera, siendo este aspecto determinante para el control del nematodo, ya que las plantas suelen presentar diferencias en su capacidad para ser colonizadas por el hongo. En términos generales se ha visto que *P. chlamydosporia* es más abundante en

raíces infectadas por nematodos en comparación con plantas sanas (Kerry, 2001).

En experimentos bajo condiciones controladas, el crecimiento del hongo en raíces infectadas por el nematodo sucede después de cinco semanas, mismas que coinciden con la aparición de las primeras masas de huevos sobre las raíces. Sobre este punto, aún no queda claro si el aumento de la densidad del hongo en este momento resulta de la colonización directa de las masas de huevos o de la disminución de alimento en la rizosfera (Kerry y Bourne, 1996).

Aunque adicionar el hongo puede aumentar las densidades de éste en la rizosfera, en algunas plantas puede no estar aumentando significativamente e incluso si se aumentase la dosis (Bourne *et al.*, 1994); por lo tanto, es importante tener en cuenta la especie de planta ya que el impacto puede a veces no ser satisfactorio. Los exudados de la raíz también tienen una gran influencia en el crecimiento del hongo, ya que éstos son el interruptor para pasar del estado saprofitico al parasítico. A ciencia cierta no se sabe qué es lo que sucede, pero al parecer el exceso de carbono inhibe la producción de las enzimas dominantes implicadas en el proceso de infección. Relacionado con este fenómeno, se sabe que la adición de enmiendas orgánicas al suelo pueden apoyar en gran medida el aumento en las densidades del hongo o bien, inhibir el parasitismo sobre los nematodos (Kerry y Bourne, 1996).

*P. chlamydosporia*, además de alimentarse de huevos de nematodos, es capaz de colonizar otros organismos como huevos de caracoles, la rizosfera de diversas plantas presentes en el suelo y la materia orgánica del suelo. Este hongo no produce trampas ni toxinas, ni tampoco parasita las etapas activas de los nematodos, sino sólo huevos y en ocasiones hembras sésiles. De ahí que la colonización de raíces sea un evento fundamental para potenciar el contacto con los huevos que se exponen sobre la superficie de las raíces o bien, con las hembras maduras del nematodo que en ocasiones también pueden salir del tejido. Estudios realizados bajo Microscopía Electrónica han evidenciado como se da el proceso de infección; al respecto se ha observado una especie de clavija que posteriormente se convierte en un apresorio el cual penetra el corion del huevo y da lugar a un bulbo del cual se forman redes de micelio que

colonizan el huevo. Se piensa que la penetración es el resultado de la presión física y la actividad enzimática mediante la cual se producen tanto quitinasas como lipasas (Kerry y Bourne, 1996).

### **2.2.2 *P. chlamydosporia*: Una alternativa para el control de nematodos fitopatógenos**

Existe una gran cantidad de especies de hongos que han sido aislados a partir de nematodos formadores de quistes y nematodos agalladores, pero menos del 10% de los aislamientos no han sido probadas para conocer su efecto parasítico sobre nematodos fitopatógenos (Kerry, 1995). *P. chlamydosporia* actualmente representa un agente de control biológico con gran potencial, ya que existen numerosos aislamientos que han mostrado su eficacia en el control, principalmente de nematodos agalladores.

*P. chlamydosporia*, como un agente potencial de control biológico de nematodos fitopatógenos de importancia agrícola, debe cumplir con una serie de requisitos los cuales permiten seleccionar y discriminar entre aquellos poco efectivos de los que potencialmente pueden explotarse a gran escala y de manera comercial. Las cinco etapas mediante las cuales cualquier aislamiento de *Pochonia spp.* debe pasar antes de su uso a nivel comercial son (Bourne *et al.*, 1994):

1. Colecta. Consiste en el aislamiento o extracción propiamente del hongo, ya sea a partir del nematodo o del suelo, continuando con la obtención de un cultivo libre de contaminantes.
2. Pruebas de laboratorio. Se llevan a cabo con el fin de determinar el potencial de control biológico de cada aislamiento previamente aislado. En esta parte se realizan pruebas de colonización de raíces, parasitismo de huevos y capacidad de producción de clamidosporas en un sustrato de crecimiento dado.
3. Determinación de las condiciones óptimas para la producción masiva de clamidosporas. Se realizan pruebas de producción masiva en diferentes condiciones y con diferentes sustratos bajo condiciones estériles.

4. Evaluación de la eficiencia de los aislamientos bajo condiciones de invernadero y determinación de los factores que pudieran limitar su eficiencia de control de nematodos. Los aislamientos son probados en el invernadero en diversas plantas, y con diferentes densidades del nematodo así como del hongo, todo bajo condiciones no estériles, muy cercanas a como sucede en campo.
5. Evaluación de la eficiencia de los aislamientos en campo. Se aplican los tratamientos (dosis, aislamientos efectivos, etc.) con mejores resultados en la etapa de invernadero, para que combinados con otras estrategias se constituya un manejo integral del sistema. Bajo estas condiciones un parte importante son los monitoreos del hongo a intervalos de tiempo previamente establecidos.

Existen otros estudios sobre *P. chlamydosporia*, que tratan de conocer mejor a este hongo; estos van desde métodos para poder identificar la hongo, el efecto de la temperatura en la interacción con el nematodo, el efecto que tienen sobre diferentes poblaciones de nematodos agalladores, la interacción de la rizosfera–nematodo–hongo, los de dosificación del hongo en el campo y finalmente los de producción masiva, aunque este último ha tenido pocos resultados satisfactorios debido a la falta de información acerca de la combinación de los factores que afectan su eficiencia (Kerry y Jaffee, 1997).

De Leij y Kerry (1991), probando tres aislamientos de *P. chlamydosporia* en plantas de tomate crecidas en suelo infestado con *Meloidogyne arenaria*, encontraron que los tres aislamientos sobrevivieron bien en el suelo aunque solamente uno logró reducir significativamente la población de nematodos. Al probar dos formas diferentes de aplicación, descubrieron que resultaba más apropiado utilizar las clamidosporas, debido a que éstas no necesitan una fuente de energía adicional comparada a la necesaria cuando la aplicación es empleando micelio. Además, no encontraron evidencia de que la presencia del hongo restringiera el desarrollo del cultivo. Por su parte Bourne *et al.* (1994) realizó pruebas con aislamientos obtenidos de suelo infestado por *Meloidogyne spp.* y *Heterodera spp.*, ello con el fin de determinar la capacidad de cada uno para colonizar la rizosfera en condiciones estériles y su habilidad parasítica en

suelo no infestado. Sus resultados mostraron que entre aislamientos puede presentarse una gran variabilidad, y que un aislamiento cuyo comportamiento en laboratorio resulte exitoso no necesariamente se comportará igual en suelo no estéril; esto puede deberse a una débil capacidad para competir con el resto de la biota del suelo. En sus bioensayos, el control de nematodos resultó más efectivo cuando las masas de huevos de *Meloidogyne spp.* se encontraban expuestas en la superficie de la raíz o embebidas en agallas pequeñas, así como cuando el parasitismo se daba en etapas tempranas del desarrollo del huevo.

Kerry (1997) en su momento, estableció una secuencia para evaluar el potencial parasítico de los diferentes aislamientos del hongo, la cual consta de dos fases: la de realización de pruebas *in vitro* y la ejecución de pruebas en campo. Entre las primeras se encuentran las pruebas de parasitismo con huevos y las pruebas de colonización de raíces de plantas susceptibles al nematodo; en esta serie de pruebas estableció que los aislamientos con potencial para utilizarse como agentes de control biológico y proceder posteriormente a su evaluación en invernadero y campo, deben registrar porcentajes de 80% o más en ambas pruebas de laboratorio. De acuerdo con Kerry (1997), las pruebas en invernadero tienen como fin fundamental conocer y estandarizar la cantidad mínima de inóculo del hongo a utilizar en trabajos a mayor escala (campo), de ahí que de manera general suele manejarse como dosis media en la mayoría de las investigaciones la de 5,000 clamidosporas por cada gramo de suelo o sustrato.

Hidalgo *et al.* (2000), llevaron a cabo un estudio en el que colectaron 83 aislamientos de diversas especies de *Pochonia*, de los cuales se eligieron 24 como representativos de la zona; diez de éstos pertenecían *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* y 13 a *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. De todos estos aislamientos se hicieron pruebas de parasitismo de huevos del nematodo agallador *Meloidogyne incognita*, porcentaje de colonización de raíces y productividad de clamidosporas en forma masiva sobre arroz quebrado como sustrato de crecimiento. En dicho estudio se encontró que el parasitismo huevos fue de 53 a 88 %, siendo mayor el de los aislamientos pertenecientes a

*P. chlamydosporia* var. *catenulata* ; por su parte la colonización de las raíces osciló entre el 46 y el 100%, correspondiendo los mejores resultados a los aislamientos de la *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

Acerca de los estudios realizados en México, Flores (2003) logró obtener algunos aislamientos mexicanos (denominados: SMB3, SMB3A, SC1, SM4 y MHCH), de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a partir de muestras de suelo y raíces, procedentes de varios predios con *N. aberrans*. Con dichos aislamientos realizó pruebas de parasitismo *in vitro*, encontrando que algunos de ellos eran capaces de parasitar más del 90% de los huevos de tres diferentes poblaciones de *N. aberrans* utilizando como planta hospedante al jitomate. Una de la pruebas realizadas fue la de parasitismo de huevos de tres diferentes poblaciones de *N. aberrans* y donde se obtuvieron porcentajes entre el 59-89%; posteriormente, y con relación a su capacidad colonizadora de raíces, observó un rango de 46-93% en dicha capacidad entre los diferentes aislamientos.

Posteriormente, Pérez (2004) realizó un estudio, en el cual se probaron los mismos cinco aislamientos reportados por Flores (2003), pero bajo condiciones de invernadero en suelo naturalmente infestado con *N. aberrans*. En dicho estudio se concluyó que las plantas tratadas con uno de los aislamientos (el denominado SC1) a una dosis de 15,000 clamidosporas g<sup>-1</sup> de suelo, presentaron la menor población de nematodos así como menores daños en planta con respecto al testigo y el resto de los tratamientos.

En un estudio más reciente, Vilchis *et al.* (2004) en México, realizaron un muestreo prospectivo para determinar la presencia de *P. chlamydosporia* en sistemas con diferentes intensidades de uso de suelo, obteniendo un total de 34 aislamientos de *P. chlamydosporia*, 26 de ellos pertenecientes a la variedad *chlamydosporia* y 8 a la variedad *catenulata*. De todos los aislamientos encontrados, se examinó su capacidad parasítica sobre huevos de una población de *N. aberrans*, encontrando una respuesta diferenciada y resaltando de todos ellos cinco, con un nivel de parasitismo mayor al 80%.

### 2.2.3 Producción masiva de *Pochonia chlamydosporia* en sustratos sólidos

Respecto al proceso de producción masiva de *P. chlamydosporia* con fines de uso a mediana y gran escala, este ha sido un tema poco tocado y del cual se cuenta con poca información generada en los últimos años. Para la producción masiva de este u otros organismos con potencial para ser usados como biocontrol 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 con ventaja que pueden ser almacenadas durante períodos muy largos y aún 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 de dicho proceso de producción masiva. A nivel mundial se ha comenzado a trabajar en la estandarización de procesos para la formulación granular de *P. chlamydosporia*, sólo que en ocasiones dichos procesos son limitados, debido a que generalmente involucran sustratos sólidos, los cuales en ocasiones son costosos e ineficientes, además de que el control de calidad del producto final en ocasiones es engorroso y poco accesible (Flores, 2003).

Entre los pocos trabajos que existen alrededor del proceso de producción masiva de *P. chlamydosporia* está el de Hidalgo *et al.* (2000), en donde se probó arroz quebrado como sustrato de crecimiento del hongo utilizando un método de fermentación bifásico. En dicho estudio se obtuvo un número de clamidosporas entre 0.3 y 5.5 X 10<sup>6</sup> g<sup>-1</sup> de sustrato colonizado, correspondiendo las mayores cantidades para los aislamientos de la variedad *chlamydosporia*. Por su parte en otro estudio, Atkins *et al.* (2003) probaron diversos sustratos para el crecimiento del hongo, encontrando que para el caso de la variedad *catenulata*, su crecimiento fue mejor en sustratos con un alto contenido de materia orgánica; además, al probar los sustratos colonizados por el hongo, observaron que los porcentajes de parasitismo eran cercanos al 70%.

En México, el primer reporte sobre pruebas de producción masiva de *P. chlamydosporia* fue el realizado por Flores (2003), quien probó tanto 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 un solo aislamiento de los cinco probados, y que los resultados en cuanto a la concentración de clamidosporas  $\text{g}^{-1}$  de sustrato colonizado oscilaron entre los 7.8 y los  $8.3 \times 10^6$ , para el caso del trigo molido+arena de cuarzo, y de  $6.4$  a  $6.9 \times 10^6$  cuando se trató del arroz bajo el método bifásico de fermentación. Este último 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.

### 3 MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo comprendió dos fases: 1) prueba de parasitismo *in vitro* sobre huevos de dos poblaciones de *N. aberrans*, y 2) producción masiva de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* sobre diferentes sustratos.

#### 3.1 PRUEBA DE PARASITISMO DE HUEVOS

Para llevar al cabo esta fase, se emplearon cinco aislamientos mexicanos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* provenientes de predios naturalmente infestados con *N. aberrans*, los cuales fueron etiquetados por Flores (2003) como SMB3, SMB3A, SC1, MHCH y SM4. Con cada uno de los aislamientos se realizaron dos experimentos con el fin de probar la capacidad parasítica de éstos sobre huevos de *N. aberrans*. En el primer experimento se utilizaron granos de arroz colonizados como fuente de inóculo de cada aislamiento. Cabe mencionar que estos granos se inocularon siguiendo el método de producción masiva de *P. chlamydosporia* propuesto por Hidalgo (2000), modificado por Pérez (2004). Respecto al segundo experimento, en éste se utilizaron crecimientos de cada aislamiento mantenidos en placas de Papa-Agar (PA) con una edad de 21 días. En ambos casos se utilizaron los cinco aislamientos mexicanos sobre huevos de dos poblaciones de *N. aberrans*, una proveniente de Tecamachalco, Puebla y la otra de Montecillo, Estado de México.

##### 3.1.1 Preparación del inóculo de *P. chlamydosporia*

En el primer experimento, se preparó una suspensión de  $5 \times 10^3$  clamidosporas  $\text{ml}^{-1}$  por cada aislamiento tomando como base la concentración de clamidosporas  $\text{g}^{-1}$  de arroz colonizado calculada para cada aislamiento. A partir de dichas estimaciones, se estableció la cantidad de arroz a utilizar, el cual se diluyó en AA 0.05% para su posterior aplicación a las unidades experimentales correspondientes (Apéndice. Inciso 2). Para el caso del segundo experimento, a cada caja con crecimiento de 21 días de edad, se le añadieron aproximadamente 5 ml de AA 0.05% y se hizo un raspado utilizando una varilla de vidrio para tal fin. De cada caja se tomaron alícuotas de 0.2 ml., las cuales se vaciaron en las unidades experimentales respectivas.

### 3. 1. 2 Extracción de huevos de *N. aberrans*

Para la obtención de huevos del nematodo, se colectaron masas de huevos a partir de raíces de jitomate agalladas por *N. aberrans*. Las masas extraídas se disgregaron con un par de jeringas de insulina en agua destilada y posteriormente se colocaron en un tubo con Agua-Agar (AA) 0.05% para preparar una suspensión concentrada de huevos. De esta suspensión, se contó el número de huevos  $\text{ml}^{-1}$  con el fin de calcular la cantidad de volumen a aplicar y así asegurar un número definido de huevos por unidad experimental. Los huevos que se utilizaron, en su mayoría se encontraban en fase embrionaria.

### 3. 1. 3 Establecimiento y evaluación de los experimentos

Cada experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar, consistiendo de 10 tratamientos (5 aislamientos X 2 poblaciones del nematodo) más dos testigos sin hongo, uno para cada población de huevos. Cada tratamiento, en ambos experimentos tuvo cinco repeticiones para dar un total de 60 unidades experimentales por experimento. Cada unidad experimental consistió en una caja Petri con AA 1.5% + antibióticos, inoculada primeramente con el hongo (excepto las correspondientes al testigo sin hongo), ello considerando los tipos de inóculo trabajados en cada experimento. Las cajas con el hongo se incubaron por espacio de 48 horas a 27°C, tiempo después del cual a cada caja se le añadió una suspensión de aproximadamente 500 huevos. Una vez colocados los huevos del nematodo en todas las unidades experimentales, las cajas se incubaron nuevamente a 27°C durante cuatro días. Transcurrido dicho período, se realizó el conteo de huevos parasitados y no parasitados, dividiéndose para ello la caja en cuatro cuadrantes y seleccionando 100 huevos al azar.

## 3. 2 PRODUCCIÓN MASIVA DEL HONGO EN DIFERENTES SUSTRATOS

### 3. 2. 1 Establecimiento y evaluación del experimento

En esta fase se evaluó la eficiencia de maíz quebrado como un sustrato de crecimiento para *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en comparación con el sustrato utilizado de manera habitual para la producción de este hongo (arroz); para tal fin, se siguió el método bifásico de producción masiva propuesto por Hidalgo (2000), modificado por Pérez (2004) (Apéndice. Inciso 3.1). Tomando como base este método, la producción masiva del hongo involucra dos fases, una de fermentación líquida y otra de fermentación sólida, utilizándose en ambas arroz (Fla-Fsa). Este proceso se tomó como testigo. Además de este método se probaron otros dos, uno en el que la fermentación líquida fue en caldo de arroz y éste se inoculó a maíz quebrado esterilizado (Fla-Fsm), y el otro que consistió en la fermentación líquida utilizando caldo de maíz quebrado, el cual fue posteriormente inoculado a bolsas con maíz quebrado esterilizado (Flm-Fsm).

El diseño del experimento fue completamente al azar, con 4 tratamientos por 5 repeticiones, dando como resultado 20 unidades experimentales o bolsas con sustrato sólido (200 g), las cuales se inocularon con 25 ml de inoculante líquido respectivo. Todos los tratamientos se evaluaron en tres fechas diferentes: 15, 21 y 28 días después de la inoculación. Utilizando como aislamiento el que demostró ser el más efectivo en las pruebas de parasitismo *in vitro* (se utilizó el denominado SC1). De cada uno de los cuatro tratamientos se tuvieron 5 repeticiones. Las variables que se evaluaron fueron: concentración de clamidosporas  $g^{-1}$  de sustrato, porcentaje de germinación de clamidosporas y número de unidades formadoras de colonias (UFC)  $g^{-1}$  de sustrato (Apéndice. Inciso 3.2).

### 3. 3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de ambas fases de trabajo se analizaron mediante un Análisis de Varianza y con base en él se procedió a hacer una Comparación de medias utilizando la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Todos los procedimientos estadísticos se hicieron utilizando el programa de cómputo Statistical Analysis System (SAS<sup>®</sup>).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PRUEBA DE PARASITISMO DE HUEVOS

En ambos experimentos hubo parasitismo de huevos (Fig. 1), presentándose diferencias entre aislamientos en su capacidad parasítica, pero sin que hubiese una diferencia notable debida a la fuente de inóculo utilizado.



Fig. 1 Huevo de *N. aberrans* parasitado por un aislamiento de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* luego de las pruebas de parasitismo *in vitro*. Alrededor del huevo parasitado se observan clamidosporas en formación.

En el experimento en el que se utilizó arroz colonizado como fuente de inóculo, de acuerdo al análisis de varianza aplicado, hubo diferencias altamente significativas (Tukey,  $\alpha=0.01$ ) en el porcentaje de parasitismo entre los aislamientos sobre ambas poblaciones del nematodo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis de varianza de los tratamientos en los que se inocularon diferentes aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a partir de arroz colonizado.

Fuente de variación	g.l	PMA	PTA
Aplicación del hongo a partir de arroz colonizado	5	0.0001**	0.0001**
Error	24	13.45	19.20
Total	29		
R <sup>2</sup>		0.988	0.986
C. V.		6.67	8.89

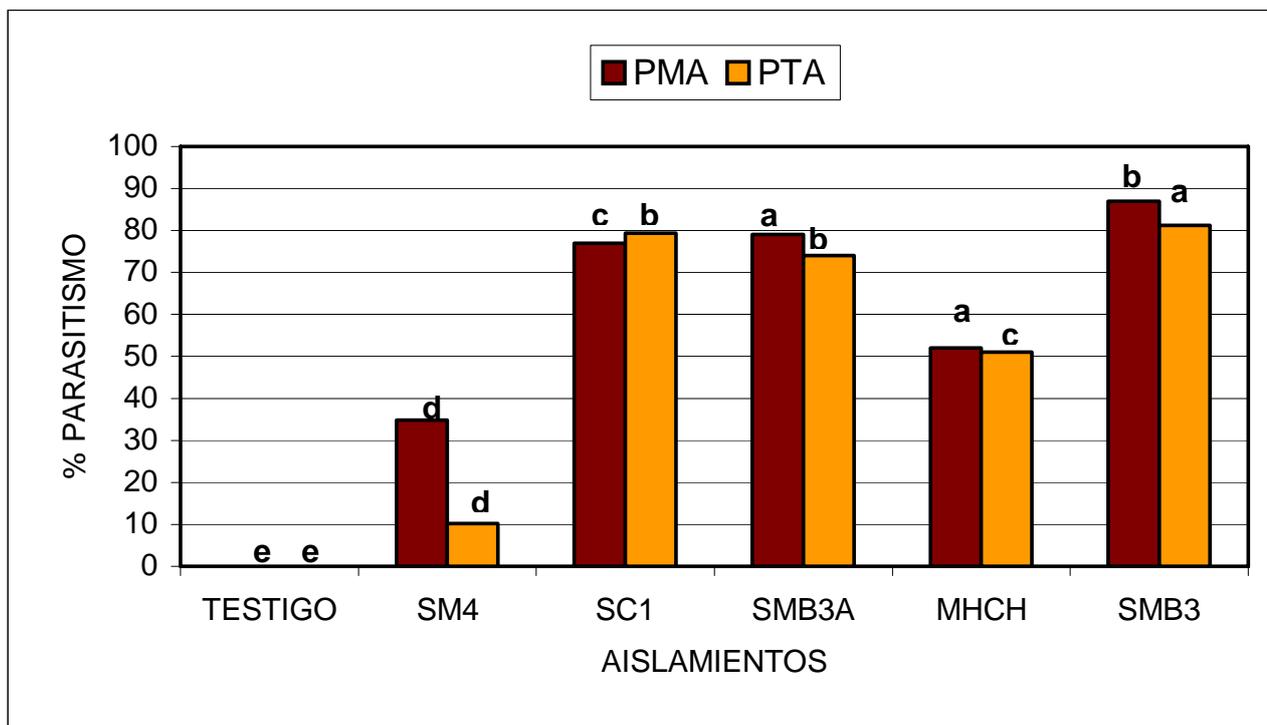
\*\*Significancia con  $\alpha = 0.01$ . C. V.= coeficiente de variación. PMA = Población de Montecillo + arroz inoculado como fuente de inóculo. PTA = Población de Tecamachalco + arroz inoculado como fuente de inóculo.

Con base en la comparación de medias (Cuadro 2), el aislamiento que mostró el mayor porcentaje de parasitismo sobre la población Montecillo fue SMB3 (87%), seguido por SMB3A (79%) y SC1 (77%). Para la población de Tecamachalco, los aislamientos exitosos fueron: SMB3 (81.2%), SC1 (79.4 %) y SMB3A (74%). Entre estos aislamientos no hubo diferencias significativas, pero si con relación a los aislamientos SM4 y MHCH. El aislamiento SM4 presentó los valores más bajos de parasitismo en ambas poblaciones (Fig. 2).

Cuadro 2. Porcentaje de parasitismo de diferentes aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a partir de arroz colonizado.

Tratamiento	PMA ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.99$ )	PTA ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.99$ )
Sin hongo (Testigo)	0.0 e	0.0 d
SM4	34.8 d	10.2 c
SC1	77.0 b	79.4 a
SMB3A	79.0 b	74.0 a
MHCH	52.0 c	51.0 b
SMB3	87.0 a	81.2 a
D. M. S.	7.1	8.5

Cifras con la misma letra no difieren significativamente ( $\alpha = 0.01$ ). PMA = Población de Montecillo + arroz inoculado como fuente de inóculo. PTA = Población de Tecamachalco + arroz inoculado como fuente de inóculo. D. M. S. = Diferencia media significativa.



ore

nuevos de dos poblaciones de *N. aberrans* (Fuente de inóculo: arroz colonizado). PMA = Población de Montecillo + arroz inoculado como fuente de inóculo. PTA = Población de Tecamachalco + arroz inoculado como fuente de inóculo. Testigo = sin aplicación del hongo.

En lo que se refiere al segundo experimento, el análisis de varianza (Cuadro 3), mostró que también hubo diferencias altamente significativas en el porcentaje de parasitismo de cada uno de los aislamientos probados (Tukey,  $\alpha = 0.01$ ).

Cuadro 3. Análisis de varianza de los tratamientos donde se inocularon diferentes aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a partir de crecimientos en PA de 21 días.

Fuente de variación	g.l	PMCP	PTCP
Aplicación de <i>P. chlamydosporia</i> a partir de crecimientos en PA (21 días).	5	0.0001**	0.0001**
Error	24	12.20	22.23
Total	29		
R <sup>2</sup>		0.989	0.978
C. V.		5.71	8.89

\*\*Significancia con  $\alpha = 0.01$ . C. V.= coeficiente de variación. PMCP = Población de Montecillo + crecimientos en PA de 21 días como fuente de inóculo. PTCP = Población de Tecamachalco + crecimientos en PA de 21 días como fuente de inóculo.

Con base en la prueba de comparación de medias de Tukey (Cuadro 4, Fig. 3), se observó que para la población de Montecillo, los aislamientos que presentaron mejores

resultados fueron SC1 (89%), SMB3 (86%) y SMBA (77.2%), esto en contraste con el aislamiento MHCH, donde se presentó el menor parasitismo (44.4%). Entre los aislamientos SC1 y SMB3 no hubo diferencias significativas, pero ambos fueron significativamente mayores al aislamiento SMB3A, SM4 y MHCH. En el caso de la población Tecamachalco, el mejor aislamiento fue SC1 (83.4%), presentando una diferencia poco significativa con los aislamientos SMB3A (79.4%) y SMB3 (78.2%). Por su parte, los aislamientos MHCH y SM4 fueron significativamente menos eficientes en su capacidad parasítica que los tres anteriores; de hecho, el aislamiento SM4 presentó el porcentaje de parasitismo más bajo (61.6%) con relación a la población de Tecamachalco, Pue.

Cuadro 4. Porcentaje de parasitismo de diferentes aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, a partir de crecimientos en PA de 21 días.

Tratamiento	PMCP ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.99$ )	PTCP ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.98$ )
Sin hongo (Testigo)	0.0 e	0.0 d
SM4	70.2 c	61.6 c
SC1	89.0 a	83.4 a
SMB3A	77.2 b	79.4 ab
MHCH	44.4 d	71.4 b
SMB3	86.0 a	78.2 ab
D. M. S.	6.83	9.22

Cifras con la misma letra no difieren significativamente ( $\alpha = 0.01$ ). PMCP = Población de Montecillos + crecimientos en PA de 21 días como fuente de inóculo. PTCP = Población de Tecamachalco + crecimientos en PA de 21 días como fuente de inóculo. D. M. S. = Diferencia media significativa.

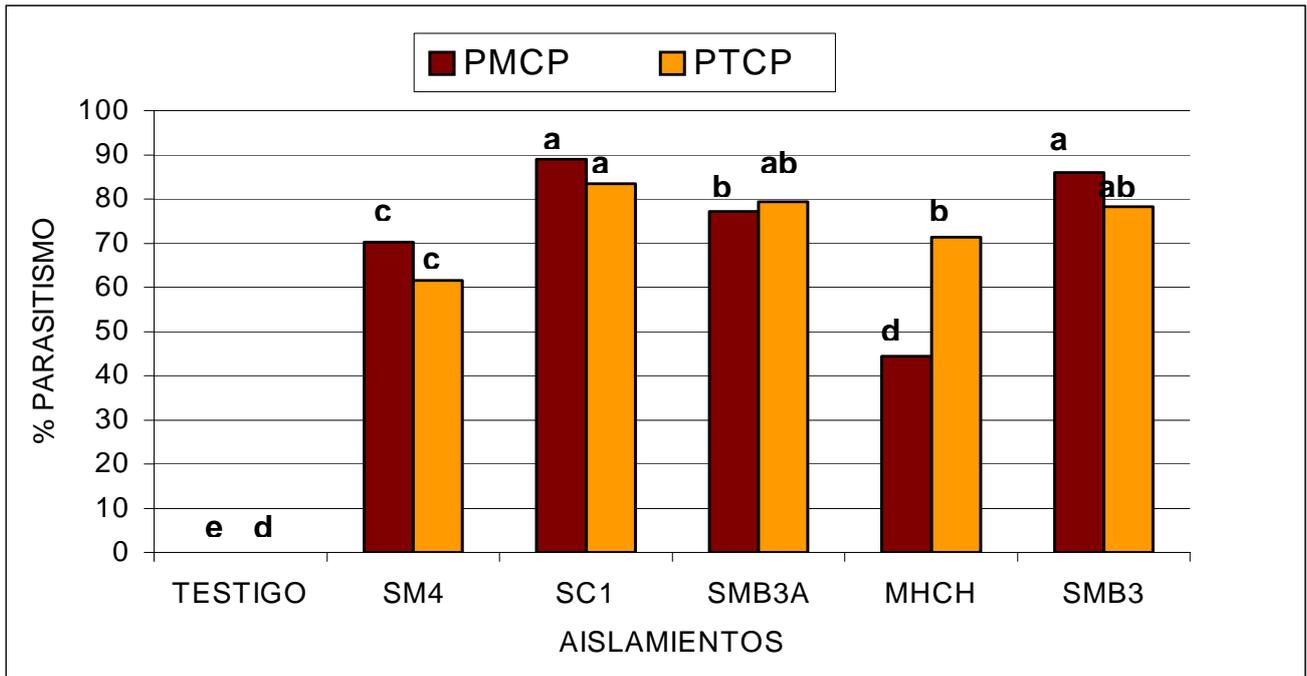


Fig 3. Parasitismo de los diferentes aislamientos probados de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* sobre huevecillos de dos poblaciones de *N. aberrans* (Fuente de inóculo: crecimiento de 21 días). PMCP = Población de Montecillos + crecimientos en PA de 21 días como fuente de inóculo. PTCP = Población de Tecamachalco + crecimientos en PA de 21 días como fuente de inóculo. Testigo = sin aplicación del hongo.

#### 4.2 PRODUCCIÓN MASIVA DEL HONGO EN DIFERENTES SUSTRATOS

En la Fig. 4 se ilustra la dinámica de producción de clamidosporas a lo largo de las tres fechas evaluadas; en dicha figura se observa que el número de clamidosporas alcanzó su máximo nivel a los 21 días posteriores a la inoculación (dpi), principalmente para el caso de los tratamientos con maíz quebrado como sustrato de crecimiento, esto independientemente del tipo de infusión utilizada en la fase líquida (arroz o maíz quebrado). Por su parte, a los 28 dpi, el número de clamidosporas decreció en ambos casos. Para el caso del tratamiento donde se utilizó arroz en ambas fases de producción, se observó que a los 28 dpi el número de clamidosporas se incrementó, condición diferente a lo observado en los otros dos tratamientos; a pesar de este incremento, el número de clamidosporas fue menor al observado en los tratamientos con maíz quebrado a los 21 dpi (Fig. 4).

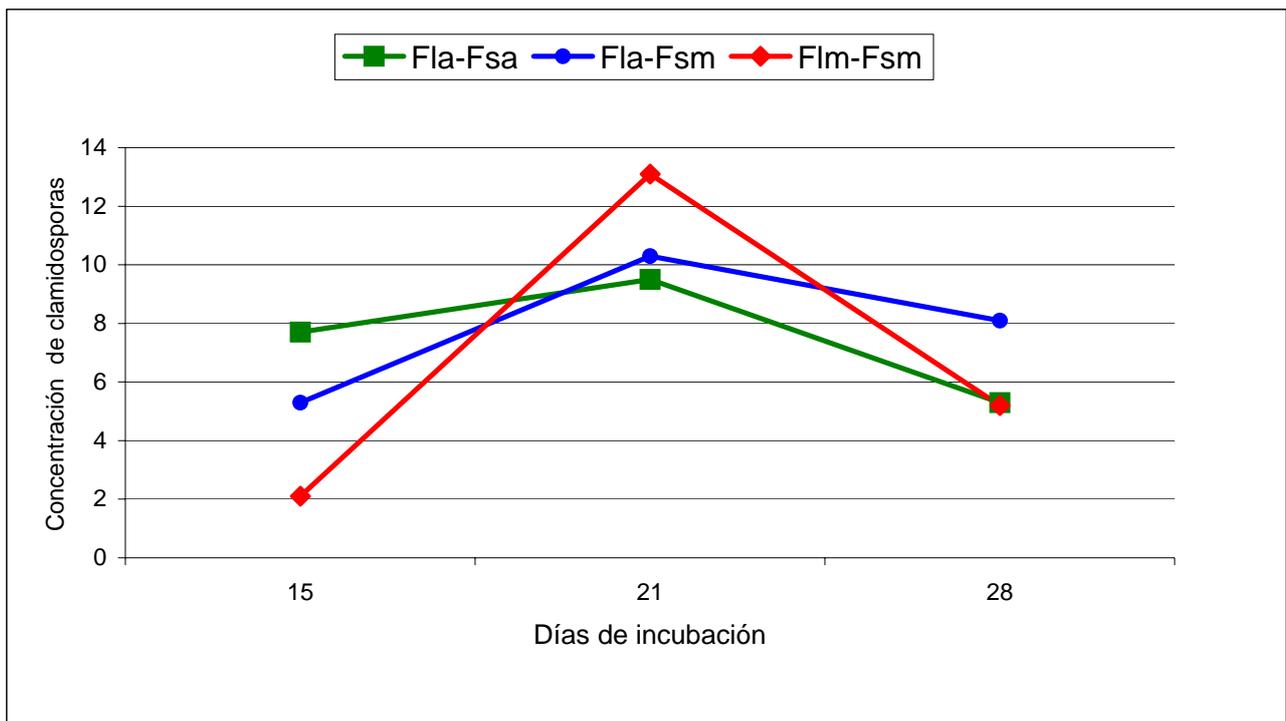


Fig. 4. Dinámica de producción de clamidosporas por un asilamiento de *P. chlamydo-sporea* var. *chlamydo-sporea*, a diferentes fechas de evaluación y utilizando diferentes sustratos de crecimiento. Fla-Fsa = fermentación líquida arroz + fermentación sólida arroz; Fla-Flm = fermentación líquida arroz + fermentación sólida maíz; Flm-Fsm = fermentación líquida maíz + fermentación sólida maíz.

Con relación a las variables evaluadas en cada fecha posterior a la inoculación, éstas se sometieron al análisis de varianza respectivo (Cuadros 5, 6 y 7).

Cuadro 5. Análisis de varianza de los diferentes tratamientos aplicados para la producción masiva de un aislamiento de *P. chlamydo-sporea* var. *chlamydo-sporea* (15 días posteriores a la inoculación).

Fuente de variación	g.l	Clamidosporas g <sup>-1</sup> de sustrato	Porcentaje de germinación de clamidosporas	UFC g <sup>-1</sup> de sustrato
Sustrato para producción masiva del hongo	2	0.0001**	0.0001**	0.0001**
Error	12		16.06	4.69
Total	14			
R <sup>2</sup>		0.9483	0.5050	0.9349
C. V.		11.89	5.73	14.55

\*\*Significancia con  $\alpha = 0.01$ . C. V.= coeficiente de variación. UFC = Unidades Formadoras de Colonias.

Cuadro 6. Análisis de varianza de los diferentes tratamientos aplicados para la producción masiva de un aislamiento de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (21 días posteriores a la inoculación).

Fuente de variación	g.l	Clamidosporas g <sup>-1</sup> de sustrato	Porcentaje de germinación de clamidosporas	UFC g <sup>-1</sup> de sustrato
Sustrato para producción masiva del hongo	2	0.0001**	0.0001**	0.0001**
Error	12	3.62	13.10	6.97
Total	14			
R <sup>2</sup>		0.4509	0.4183	0.9373
C. V.		17.36	4.74	14.26

\*\*Significancia con  $\alpha = 0.01$ . C. V. = coeficiente de variación. UFC = Unidades Formadoras de Colonias.

Cuadro 7. Análisis de varianza de los diferentes tratamientos aplicados para la producción masiva de un aislamiento de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (28 días posteriores a la inoculación).

Fuente de variación	g.l	Clamidosporas g <sup>-1</sup> de sustrato	Porcentaje de germinación de clamidosporas	UFC g <sup>-1</sup> de sustrato
Sustrato para producción masiva del hongo	2	0.0001**	0.0001**	0.0001**
Error	12	1.73	10.83	9.52
Total	14			
R <sup>2</sup>		0.5657	0.8015	0.9820
C. V.		21.23	4.32	6.03

\*\*Significancia con  $\alpha = 0.01$ . C. V. = coeficiente de variación; UFC = Unidades Formadoras de Colonias.

En las tres fechas de evaluación se presentaron diferencias significativas entre tratamientos para las diferentes variables evaluadas ( $\alpha=0.01$ ). Ahora bien, de cada fecha también se hizo la comparación de medias correspondiente, ello con el fin de determinar entre cuáles tratamientos hubo diferencias entre sí y en qué orden de magnitud (Cuadros 8, 9 y 10).

Cuadro 8. Producción masiva de un aislamiento de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en

Tratamiento	Clamidosporas g <sup>-1</sup> de sustrato ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.94$ )	Porcentaje de germinación (%) ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.50$ )	UFC g <sup>-1</sup> de sustrato ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.93$ )
Fla-Fsa	7.7 X 10 <sup>6</sup> a	66.2 b	1.5 X 10 <sup>7</sup> a
Fla-Fsm	5.3 X 10 <sup>6</sup> b	74.8 a	5.7 X 10 <sup>7</sup> b
Flm-Fsm	2.1 X 10 <sup>6</sup> c	68.6 ab	7.0 X 10 <sup>7</sup> c
D. M. S.	1.01	6.76.	1.16

diferentes sustratos de crecimiento (15 días posteriores a la inoculación).

Cifras con la misma letra no difieren significativamente ( $\alpha = 0.01$ ). Fla-Fsa = fermentación líquida arroz+fermentación sólida arroz; Fla-Flm = fermentación líquida arroz+fermentación sólida maíz; Flm-Fsm = fermentación líquida maíz+fermentación sólida maíz; D. M. S = diferencia mínima significativa. UFC = Unidades Formadoras de Colonias.

Cuadro 9. Producción masiva de un aislamiento de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en diferentes sustratos de crecimiento (21 días posteriores a la inoculación).

Tratamiento	Clamidosporas g <sup>-1</sup> de sustrato ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.94$ )	Porcentaje de germinación (%) ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.50$ )	UFC g <sup>-1</sup> de sustrato ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.93$ )
Fla-Fsa	9.5 X 10 <sup>6</sup> c	75.0 ab	1.8 X 10 <sup>7</sup> b
Fla-Fsm	10.3 X 10 <sup>6</sup> ab	80.0 a	7.3 X 10 <sup>7</sup> a
Flm-Fsm	13.1 X 10 <sup>6</sup> a	73.6 c	8.4 X 10 <sup>7</sup> a
D. M. S.	3.21	6.10	1.41

Cifras con la misma letra no difieren significativamente ( $\alpha = 0.01$ ). Fla-Fsa = fermentación líquida arroz+fermentación sólida arroz; Fla-Flm = fermentación líquida arroz+fermentación sólida maíz; Flm-Fsm = fermentación líquida maíz+fermentación sólida maíz; D. M. S = diferencia mínima significativa. UFC = Unidades Formadoras de Colonias.

Cuadro10. Producción masiva de un aislamiento de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en diferentes sustratos de crecimiento (28 días posteriores a la inoculación).

Tratamiento	Clamidosporas g <sup>-1</sup> de sustrato ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.94$ )	Porcentaje de germinación (%) ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.50$ )	UFC g <sup>-1</sup> de sustrato ( $\alpha=0.01$ ; $r^2=0.93$ )
Fla-Fsa	5.3 X 10 <sup>6</sup> b	68.4 c	2.6 X 10 <sup>7</sup> c
Fla-Fsm	8.1 X 10 <sup>6</sup> a	77.0 b	5.2 X 10 <sup>7</sup> b
FIm-Fsm	5.2 X 10 <sup>6</sup> b	82.8 a	7.6 X 10 <sup>7</sup> a
D. M. S.	2.22	5.55	5.21

Cifras con la misma letra no difieren significativamente ( $\alpha = 0.01$ ). Fla-Fsa = fermentación líquida arroz+fermentación sólida arroz; Fla-Fsm = fermentación líquida arroz+fermentación sólida maíz; FIm-Fsm = fermentación líquida maíz+fermentación sólida maíz; D. M. S = diferencia mínima significativa. UFC = Unidades Formadoras de Colonias.

Con base en las pruebas de comparación de medias, se observa que a los 15 dpi, la mayor concentración de clamidosporas corresponde al tratamiento Fla-Fsa, con un valor de 7.7 X 10<sup>6</sup> clamidosporas g<sup>-1</sup> de sustrato, seguido por el tratamiento Fla-Fsm con 5.3 X 10<sup>6</sup> clamidosporas g<sup>-1</sup> de sustrato, y finalmente por el tratamiento FIm-Fsm, con 2.1 X 10<sup>6</sup> clamidosporas g<sup>-1</sup> de sustrato. En cuanto al porcentaje de germinación de clamidosporas, los valores mayores correspondieron a los tratamientos Fla-Fsm y FIm-Fsm, con 74.0 y 68.6%, respectivamente. Respecto al número de UFC g<sup>-1</sup> de sustrato, el mayor valor se presentó con el tratamiento FIm-Fsm, con 7.0 X 10<sup>7</sup> UFC g<sup>-1</sup> de sustrato, seguido por el tratamiento Fla-Fsm, con 5.7 X 10<sup>7</sup> UFC g<sup>-1</sup> de sustrato (Cuadro 8; Fig. 5).

A los 21 dpi, y con base en la prueba de comparación de medias, la mayor concentración se obtuvo con los tratamientos FIm-Fsm (13.1 X 10<sup>6</sup> clamidosporas g<sup>-1</sup>) y Fla-Fsm (10.3 X 10<sup>6</sup> clamidosporas g<sup>-1</sup>); la menor concentración correspondió al tratamiento Fla-Fsa, con 9.5 X 10<sup>6</sup> clamidosporas g<sup>-1</sup>. El mayor porcentaje de germinación de clamidosporas correspondió al tratamiento Fla-Fsm (80%) y FIm-Fsm (75%). Con relación a las UFC, el tratamiento con el mayor número fue FIm-Fsm (8.4 X 10<sup>7</sup> UFC g<sup>-1</sup>), seguido por el tratamiento Fla-Fsm (7.3 X 10<sup>7</sup> UFC g<sup>-1</sup>) (Cuadro 9; Fig. 6).

Finalmente, a los 28 dpi, la mayor concentración de clamidosporas se obtuvo con el tratamiento Fla-Fsm (8.1 X 10<sup>6</sup> clamidosporas g<sup>-1</sup>), seguido del tratamiento Fla-Fsa (5.3 X 10<sup>6</sup> clamidosporas g<sup>-1</sup>) y luego del tratamiento FIm-Fsm (5.2 X 10<sup>6</sup> clamidosporas g<sup>-1</sup>); entre estos dos tratamientos no hubo diferencias significativas. En el tratamiento en el que obtuvo un mayor porcentaje de germinación fue el FIm-Fsm con 82.8%, seguido del tratamiento Fla-Fsm con 77.0%. Respecto al número de UFC, el tratamiento con el cual

se obtuvo el número más alto fue el Flm-Fsm, con  $7.6 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$ , seguido del tratamiento Fla-Fsm con  $5.2 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  (Cuadro 10; Fig. 7).

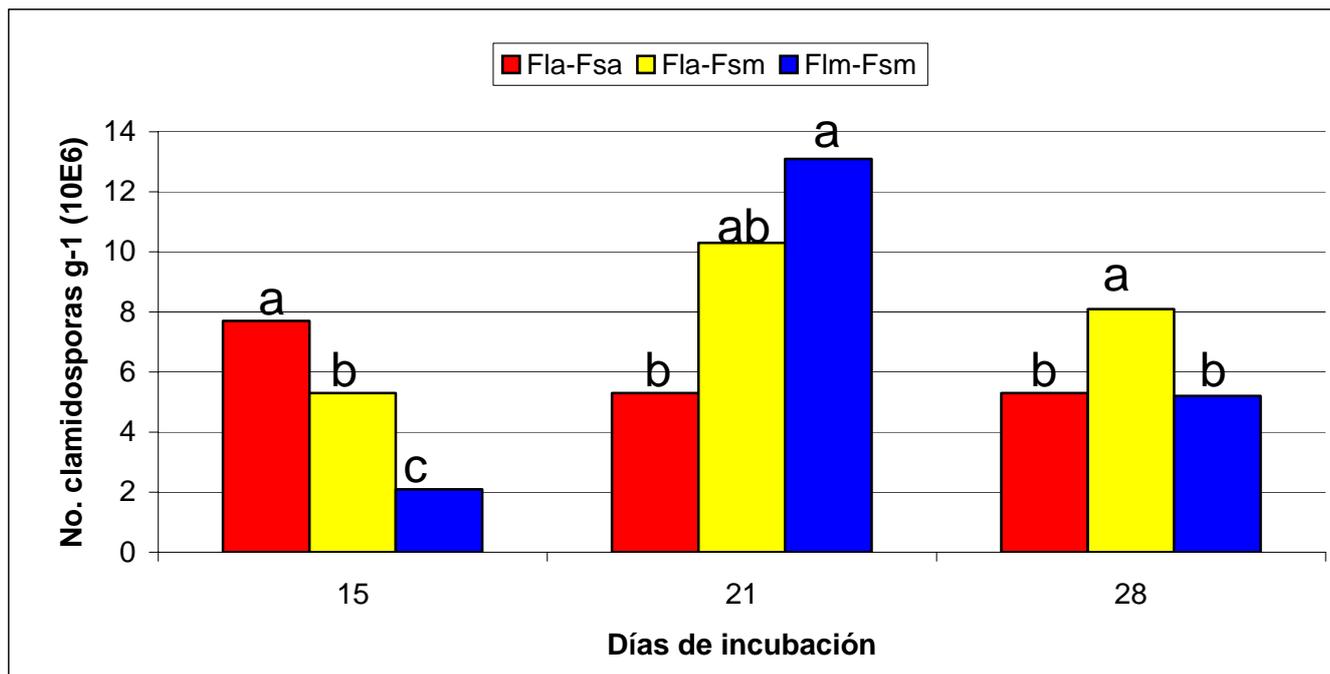


Fig. 5. Número de clamidosporas  $g^{-1}$  de sustrato, de un aislamiento de *P. chlamydozoaria* var. *chlamydozoaria* a diferentes fechas de evaluación y utilizando diferentes sustratos de crecimiento. Fla-Fsa = fermentación líquida arroz+fermentación sólida arroz; Fla-Fsm = fermentación líquida arroz+fermentación sólida maíz; Flm-Fsm = fermentación líquida maíz+fermentación sólida maíz.

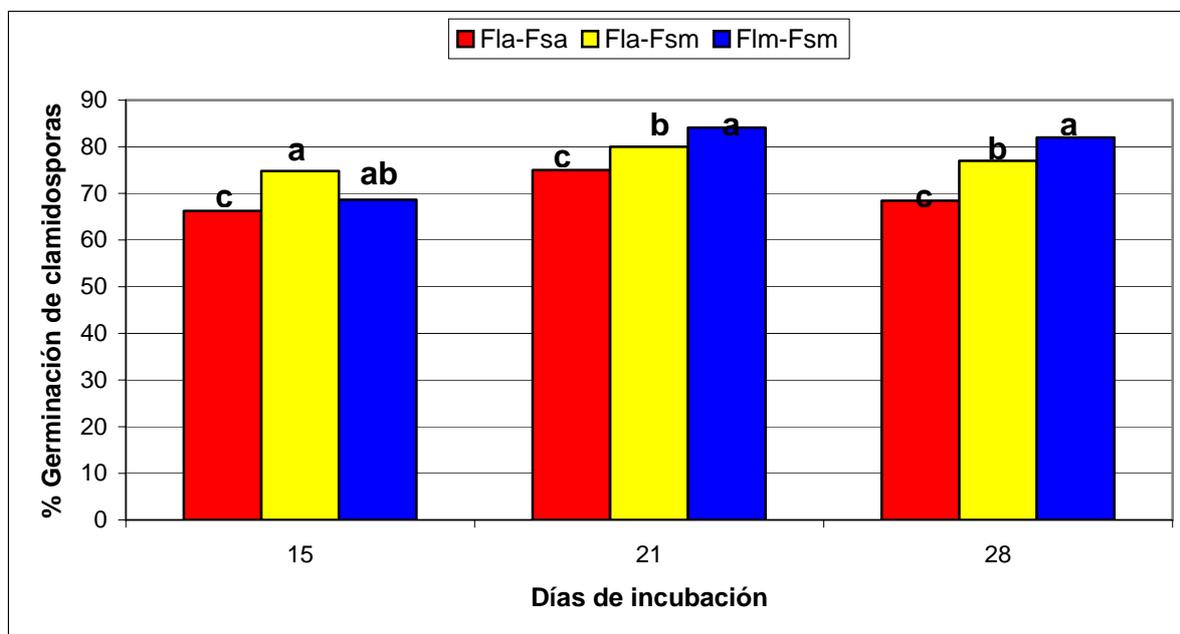


Fig. 6. Porcentaje de germinación de clamidosporas de un aislamiento de *P. chlamydozoaria* var. *chlamydozoaria*, a diferentes fechas de evaluación y utilizando diferentes sustratos de crecimiento. Fla-Fsa = fermentación líquida arroz+fermentación sólida arroz; Fla-Fsm = fermentación líquida arroz+fermentación sólida maíz; Flm-Fsm = fermentación líquida maíz+fermentación sólida maíz.

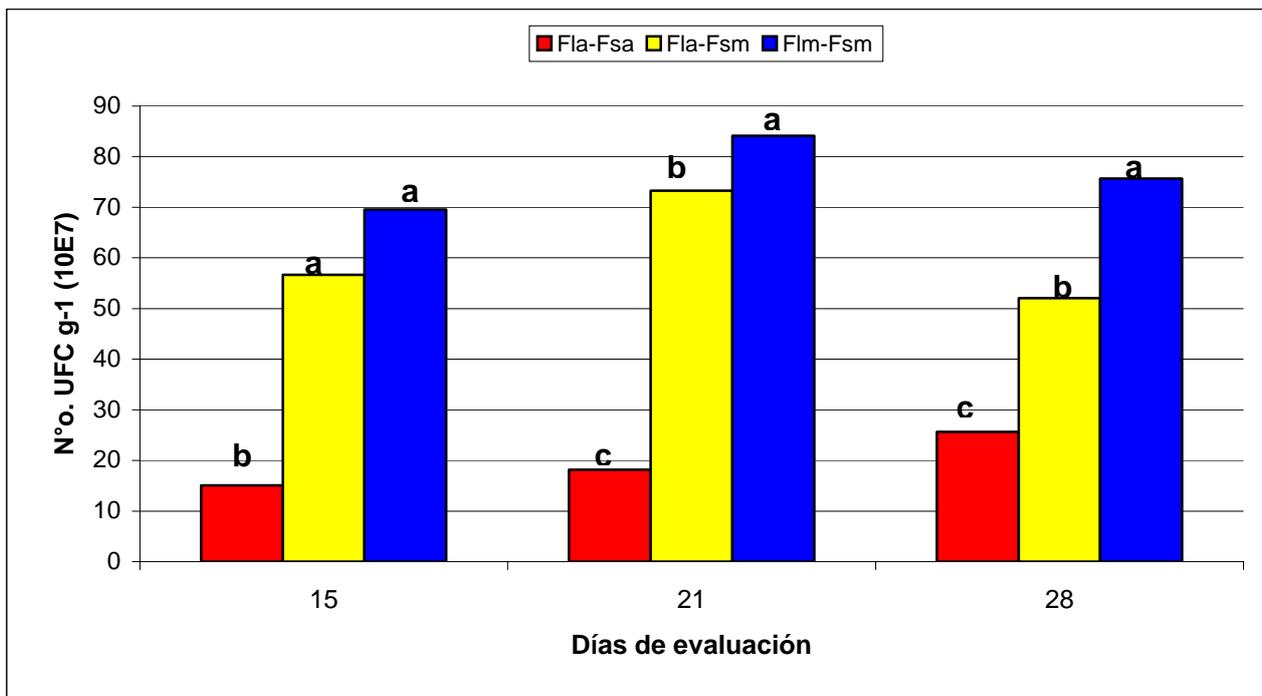


Fig. 7. Numero de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)  $g^{-1}$  de sustrato, de un aislamiento de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, a diferentes fechas de evaluación y utilizando diferentes sustratos de crecimiento. Fla-Fsa = fermentación líquida arroz+fermentación sólida arroz; Fla-Flm = fermentación líquida arroz+fermentación sólida maíz; Flm-Fsm = fermentación líquida maíz+fermentación sólida maíz.

## 5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas de parasitismo *in vitro* sobre huevos de *N. aberrans*, se observó que los aislamientos SMB3, SMB3A y SC1 mostraron los más altos porcentajes de parasitismo, siendo éstos mayores al 75% para el caso de las dos poblaciones del nematodo probadas, ello independientemente de la fuente de inóculo. De manera general, se observó que los aislamientos antes mencionados presentaron un crecimiento rápido en las placas de A-A e infectaron rápida y agresivamente a los huevos que principalmente se encontraban en fase embrionaria, no así cuando los huevos presentaban una fase más avanzada de su desarrollo (fase larvaria); este fenómeno ha sido observado y documentado con anterioridad por Kerry (1997). Respecto a los aislamientos MHCH y SM4, ambos presentaron parasitismos menores al 60%, un porcentaje por debajo del mínimo requerido para considerar a un aislamiento de este hongo con potencial para su uso en el control biológico de nematodos (Flores, 2003).

A diferencia de los obtenido en este ensayo, en uno previo realizado por Flores (2003) con estos cinco aislamientos, se alcanzó un mayor porcentaje de parasitismo con los

aislamientos MHCH y SM4 sobre tres poblaciones del nematodo falso nodulador. Cabe mencionar que ambos aislamientos fueron los de menor parasitismo en el presente estudio, situación que en este ensayo quedó bien fundamentada y reforzada luego de haber llevado al cabo las pruebas de parasitismo utilizando dos fuentes de inóculo diferentes y sobre dos poblaciones diferentes del nematodo. En el presente estudio, todos los resultados de parasitismo fueron consistentes entre sí, situación que no puede afirmarse en el caso de las pruebas conducidas por Flores (2003), quien sólo probó una fuente de inóculo (crecimientos de 21 días de edad) y cuyo comportamiento sobre huevos de diferentes poblaciones de *N. aberrans* fue poco consistente. En otro estudio realizado por Hidalgo *et al.* (2000), se encontró que los porcentajes de parasitismo en pruebas realizadas utilizando huevos de *Meloidogyne incognita* fueron entre 53 y 73% para aislamientos de *P. c. var. chlamydosporia*, y entre 51 y 88% para aislamientos de *P. c. var. catenulata*. Respecto a estos resultados, algunos de los aislamientos mexicanos probados, y sin importar la fuente de inóculo empleada, presentaron porcentajes de parasitismo elevados con respecto a los registrados por Hidalgo *et al.* (2000). En el caso del parasitismo por aislamientos de la variedad *chlamydosporia*, los porcentajes reportados fueron entre aproximadamente 16% menores a los observados en el presente estudio, para ambas poblaciones e independientemente de la fuente de inóculo. Por otro lado, los aislamientos de la variedad *catenulata* en dicho estudio, presentaron porcentajes de parasitismo muy similares a los mejores aislamientos de este trabajo. Esta similitud en la capacidad parasítica entre los aislamientos cubanos de *catenulata* y los mexicanos de *chlamydosporia* resulta alentador, sobre todo si se toma en cuenta que *catenulata* suele ser la variedad más agresiva; esta situación indicaría en un momento dado, que algunos de los aislamientos mexicanos probados tienen un potencial agresivo casi igual al de la variedad más prometedora de *P. chlamydosporia* (Hidalgo *et al.*, 2000). Es importante señalar que aunque se probaron dos fuentes de inóculo (una en cada experimento), no hubo diferencias significativas en el nivel de parasitismo obtenido por cada aislamiento probado, situación que da un fuerte sustento metodológico a lo observado en el presente estudio. Es de resaltar que una de las fuentes de inóculo probadas fue arroz colonizado masivamente por el hongo, ya que éste es el vehículo más práctico y prometedor en lo que respecta al uso del hongo para el control biológico de nematodos fitopatógenos.

Con relación al uso de un sustrato alternativo al que convencionalmente se usa para la producción masiva de *P. chlamydosporia*, y de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se observó que la combinación con mejores resultados fue la que consistió

en el uso de maíz quebrado en ambas fases de fermentación, principalmente cuando el sustrato sólido fue evaluado a los 21 días posteriores a la inoculación. Es importante mencionar que para los tres tratamientos probados en la segunda fase de este trabajo, se presentaron picos en el número de clamidosporas por gramo de producto justo a los 21 días posteriores a la inoculación, mismos que representan niveles máximos de dichas estructuras de resistencia. En todos los casos hubo una reducción en el número de clamidosporas a los 28 días posteriores a la inoculación, fenómeno que da cuenta de que la prolongación en el tiempo de incubación no es garantía de una mayor producción de clamidosporas. Dicho fenómeno se ilustra en la Fig. 4, y en ella se muestra que la dinámica de producción de clamidosporas por *P. c. var. chlamydosporia* está relacionada con una producción elevada de micelio y baja de clamidosporas en una primera fase; conforme pasan los días, las esporas germinan y el hongo continúa creciendo sobre el sustrato que aún resta por colonizarse hasta que éste se encuentre completamente cubierto y así se alcance un tope de producción, el cual no necesariamente corresponderá con el mayor número de clamidosporas por gramo de sustrato.

En el caso de la primera fecha de evaluación (15 dpi), bajo el tratamiento en el que ambas fermentaciones se hicieron con arroz, se obtuvo una mayor concentración de clamidosporas; sin embargo, este no fue el caso para la germinación de clamidosporas y el número de unidades formadoras de colonias; estas dos últimas variables también son importantes en la valoración del proceso de producción masiva de *P. chlamydosporia*, ya que aunado a un gran número de clamidosporas debe haber elevada germinación de las mismas y además el sustrato debe contar con un elevado número de unidades, diferentes a las clamidosporas, a partir de las cuales se formen nuevas colonias del hongo que le permitan establecerse en suelo y posteriormente se logre una pronta colonización de las raíces de las plantas a las cuales se pretende proteger.

Con relación a la segunda fecha de evaluación, el mejor tratamiento fue el que consistió en el uso de maíz quebrado en ambas fases de producción, una combinación que pudo haber favorecido el crecimiento del hongo por aquello que Atkins *et al.* (2003) consideran como una mayor riqueza en cantidad de materia orgánica por parte del sustrato en el cual crece el hongo. Finalmente, en la última fecha de evaluación, bajo el tratamiento donde se utilizó arroz en ambas fases se obtuvo un mayor número de clamidosporas; pese a ello, el tratamiento con maíz quebrado en ambas fases volvió a arrojar mayores valores en cuanto a al porcentaje de germinación de clamidosporas y el número de unidades

formadoras de colonias por gramo de sustrato. Esta combinación de resultados en el tiempo fundamenta el hecho de que el uso de maíz quebrado tanto en la fermentación líquida como en la sólida, no sólo permite obtener una mayor concentración de unidades de resistencia del hongo (clamidosporas) en el tiempo que generalmente se ha estipulado para el proceso de producción masiva y que es de 21 días (Hidalgo, 2000; Pérez, 2004), sino que además si el proceso se prolongara siete días más (28 días en total), al menos las otras dos variables consideradas mantienen los mayores niveles. A pesar de que el proceso convencional con arroz nos arroja una mayor cantidad de clamidosporas por gramo de producto a los 28 días, esto no resulta del todo ventajoso, ya que implicaría prolongar el período de incubación y ello en términos de eficiencia del proceso no es conveniente.

Considerando los resultados de Hidalgo (2000), quien probó arroz quebrado como sustrato de crecimiento del hongo utilizando el mismo método de fermentación bifásico, obtuvo una concentración de clamidosporas, a los 21 dpi, entre  $0.3$  y  $5.5 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$  de sustrato colonizado, correspondiendo las mayores cantidades para los aislamientos de la variedad *chlamydsoporia*; en comparación con los resultados de este estudio, la mayor concentración de los aislamientos cubanos fue 58 % menor que la arrojada por el aislamiento mexicano producido en maíz quebrado en ambas fase de fermentación. Ahora bien, si se comparan los resultados obtenidos en este trabajo con los que Flores (2003) obtuvo utilizando tanto trigo molido+arena de cuarzo como arroz con el método bifásico, para ambos casos la producción de clamidosporas fue menor que las producidas con maíz quebrado, ya que al utilizar trigo molido+arena de cuarzo el número de clamidosporas fue 36% menor al de este estudio, y utilizando arroz en ambas fases el número de clamidosporas fue 47% menor al obtenido cuando se utilizó maíz quebrado en las dos fases.

Si se toma en cuenta que la producción de organismos benéficos a mediana y gran escala requiere de un método estandarizado que sea práctico, operativo y económicamente viable para su desarrollo, y que además debe redundar en un producto de alta calidad y de fácil transporte y aplicación para su incorporación en esquemas de control integrado de nematodos fitopatógenos, los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a la mejora del método de producción masiva de *P. chlamydsoporia* son alentadores y se presentan como una buena alternativa para la producción del hongo. El hecho de que al utilizar maíz quebrado, el cual resultó ser 2.5 veces más barato que el que se usa convencionalmente (arroz) para producir masivamente a *P. chlamydsoporia*, se hayan

obtenidos los mayores valores de calidad de producto en el tiempo de incubación recomendado, es un indicativo de que el método original puede irse perfeccionando poco a poco y adaptándose a las condiciones de disponibilidad de materiales de las diferentes áreas o regiones de producción, esto sin demeritar la calidad y rendimiento del producto final. El presente estudio es una importante contribución al estado del conocimiento de los métodos de producción masiva de *P. chlamydosporia*, ya que aporta nuevos elementos y da alternativas ventajosas y viables para la mejora en la calidad y rendimiento del producto utilizando un sustrato más económico, de fácil acceso y que garantiza una mejor producción de las unidades a incorporar e suelo para el control biológico de nematodos, principalmente agalladores y el falso nodulador.

Finalmente, es importante hacer hincapié en el hecho de que se necesitan realizar más ensayos en la materia para obtener una formulación que sea aún más práctica de usar y aplicar en campo, y que sobre todo, no implique un encarecimiento en los costos de producción y por consecuencia de comercialización, lo que directamente incidiría en quienes serían los principales beneficiados de estas prácticas de control de enfermedades, los pequeños y medianos productores.

## 6 CONCLUSIONES

1. Los aislamientos mexicanos de *P. c. var. chlamydosporia* que mostraron mayor porcentaje de parasitismo de huevos de dos poblaciones de *N. aberrans* fueron SC1, SMB3 y SMB3A, independientemente de la fuente de inóculo empleada.
2. Los aislamientos SMB3, SC1 y SMB3A mostraron la mayor capacidad parasítica de huevos de *N. aberrans* de las poblaciones Montecillo y Tecamachalco, sin importar la fuente de inóculo.
3. 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 líquida con maíz quebrado seguida de la fermentación sólida también con maíz quebrado.
4. En general, el maíz quebrado mostró mejores resultados como sustrato de crecimiento de *P. c. var. chlamydosporia*, comparado con el sustrato utilizado convencionalmente para la producción masiva de este hongo (arroz).
5. El maíz quebrado puede servir como sustituto del arroz en cuanto a su uso como sustrato para la producción masiva de *P. chlamydosporia*, sin detrimento en la calidad del producto final y garantizando un menor costo.

## 7 LITERATURA CITADA

1. Atkins, S. D., Hidalgo, D. L., Kalisz, H., Mauchline, T. H., Hirsch, P. R. y Kerry, B. R. 2003. Development for a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) in organic vegetable production. *Pest Management Science* 59: 183-189.
2. Bourne J.M., Kerry B. R., De Leij, F. A. A. M. 1994. Methods for the Study of *Verticillium chlamydosporium* on the Rhizosphere. Supplement of *Journal of Nematology* 26: 587-591.
3. Brunner-de Magar, P. 1967. Jicamilla del chile causada por un nuevo nematodo y obtención de fuentes de resistencia. *Agrociencia* 2:76-79.
4. Cid del Prado, V. I. 1985. Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. *In: Fitonematología Avanzada I.* Marbán, M. N. y Thomason, I. J. (eds.). Colegio de Postgraduados, México. pp. 57-65.
5. Cid del Prado-Vera, I., y García, T. J. 1991. Determinación de razas de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1994 presentes en México. *Avances de Investigación.* Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. p. 131.
6. Cid del Prado-Vera, I. y Manzanilla-López, R. H. 1992. Gama de hospedantes de diferentes poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans* (Thome, 1935) Thome y Allen. 1994. *Avances de Investigación.* Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. p 14.
7. Cid del Prado-Vera, I., Evans, K., Manzanilla-López, R. H., Cristóbal-Alejo, J., Franco-Avila, G. E. y Flores-Camacho, R. 1996. Gama de hospedantes de poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans* (Thome, 1935) Thome y Allen, 1944. *Avances de Investigación.* Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. p. 107.
8. Clark, S. A. 1967. The development and life history of the false root-knot nematode, *Nacobbus serendipiticus*. *Nematologica* 13:91-101.
9. Cristóbal, A. J., I. Cid del Prado V., G. P. Sánchez, N. Marbán-Mendoza, L. R. H. Manzanilla, y G. Mora-Aguilera. 2001. Nutritional disorders in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) due to infestation by *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 31:221-228.
10. De Leij, F. A. A. M y Kerry B. R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard, as a potencial biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. *Revue Nematologie* 14:157-164.

11. Domsch, K. H. y Gams, W. 1980. Compendium of soil fungi. Vol I. Academic Press. London, LTD. 859 p.
12. Flores C. R. 2003. Búsqueda y aislamiento de algunos hongos nematófagos para el control de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1995) Thorne y Allen, 1944 en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 99 p.
13. Franklin, M. T. 1959. *Nacobbus serendipiticus* n sp., a root-galling nematode from tomatoes in England. *Nematologica* 4:286-293.
14. Gams W. y Zare R. 2001. A revision of *Verticillium* sect Prostrata. III. Generic clasification. *Nova Hedwigia* 72:329-337.
15. Hidalgo D.L., Bourne M.J., Kerry B.R & Rodriguez M.G. 2000. Nematophagus *Verticillium* spp. in soil infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management*. 46:277-284.
16. Kerry, B. 1995. Ecological considerations for the use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Canadian Journal of Botany* 73:565-570.
17. Kerry, 2001. Exploitation of the nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *In: Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential.* T. M. Butt, C. Jackson y N. Magan (eds.). CABI Publishing International, UK. pp 155-167.
18. Kerry, B. R. y Boume, J. M. 1996. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pest Science* 47:69-75.
19. Kerry, B. R. 1997. A workshop manual for research on *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for root-knot nematodes. *Integrated Approach to Crop Research.* Rothamsted Long Ashton Broom's Barn UK. 90 p.
20. Kerry, B. R. y Jaffee, B. A. 1997. Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. *The Mycota* 4:203-218.
21. Luc, R., Sikora, A. y Bridge, J. 1990. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical Agriculture.* CAB International, U. K. 416 p.
22. Manzanilla, L. R. E., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R. N., Lehman, P. S., Cid del Prado, V. I., Souza, R. M. y Evans, K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, Distribution, Biology and Management. *Nematropica*. 32(2): 149-227.

23. Pérez, R. I. 2004. Eficiencia de cinco aislamientos del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* Goddard para el control de *Nacobbus aberrans* Thorne & Allen 1944 en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis de Licenciatura. ITA 29. Tlaxcala. 64 p.
24. Rodríguez-Kabana, R. 1991. Control biológico de nematodos parásitos de plantas. *Nematropica* 21:111 -122.
25. Silva, J. J. 1989. Manejo de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944, asociado al cultivo de frijol en el Valle de Valsequillo, Puebla. Tesis de Maestro en Ciencias. Especialidad de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Estado de México, México. 150 p.
26. Stirling, G. R. y Mankau, R. 1978. Parasitism of *Meloidogyne* eggs by a new fungal parasite. *Journal Nematology* 10:236-240.
27. Toledo, R. J. C. 1990. Caracterización patogénica de cinco poblaciones de *Nacobbus aberrans* y evaluación de daño que causa a tomate, chile y frijol en México. Tesis de Maestro en Ciencias Agrícolas. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 63 p.
28. Vilchis M. K., Franco, N. F. y Hernández, J. A. 2004. New isolates of *Pochonia chlamydosporia* and their parasitism on the false root-knot nematode, *Nacobbus aberrans*. Abstract XXXVI Annual Meeting Organization of Nematologists of Tropical America. O-49.
29. Zamudio, G. V. 1987. Evaluación de la resistencia de colecciones y variedades comerciales de tomate a *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 88 p.
30. Zare, R., Gams, W., Culham, A. 2000. A revisión of *Verticillium* sect. *Prostrata*. I. Phylogenetic studies using ITS sequences. *Nova Hedwigia*. 71: 465 - 480.
31. Zare R., Gams W, & Evans H.C. 2001. A revisión of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*. 73:51-86.

## APÉNDICE

### 1 ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

#### **Papa-Agar + antibióticos (para 1L de agua)**

- 50 g de papa pelada y partida.
- 13 g de agar-agar.
- Antibióticos

Se agregan los fragmentos de papa a agua destilada hirviendo y se dejan durante media hora en ebullición; posteriormente, el agua con la papa se retira del calor y se deja reposar la infusión hasta que se enfríe. Una vez enfriada la infusión, ésta se pasa por triple gasa a una probeta y se afora a un litro si es necesario. A la infusión se le agrega el agar y se disuelve. La mezcla se esteriliza a 121°C durante 20 min. Una vez esterilizado el medio, y ya que sea tolerable al tacto, se le añaden los siguientes antibióticos: 50 mg de sulfato de estreptomicina, 50 mg de clorafenicol y 50 mg de clorotetraciclina.

#### **Agua-Agar 1.5% + antibióticos (para 1L de agua)**

- 15 g de agar-agar
- Antibióticos

Se disuelve el agar-agar en el agua destilada y se esteriliza a 121°C durante 20 min. Una vez esterilizado el medio, se deja enfriar hasta que sea tolerable al tacto y se le agregan: 50 mg de sulfato de estreptomicina, 50 mg de clorafenicol y 50 mg de clorotetraciclina

## 2 CÁLCULOS PARA PREPARAR EL INÓCULO DE *P. chlamydosporia*

Cuadro 11. Suspensión de clamidosporas aplicada para cada aislamiento en el primer experimento de parasitismo *in vitro*.

3	Aislamiento	Clamidosporas g <sup>-1</sup> arroz colonizado	Dilución	Volumen de la suspensión (ml)
	SMB3	1.8 X 10 <sup>7</sup>	10 <sup>-3</sup>	0.2
	SC1	0.6 X 10 <sup>7</sup>	10 <sup>-3</sup>	0.2
	SMB3A	1.7 X 10 <sup>7</sup>	10 <sup>-3</sup>	0.2
	MHCH	1.4 X 10 <sup>6</sup>	10 <sup>-4</sup>	0.8
	SM4	1.3 X 10 <sup>5</sup>	10 <sup>-4</sup>	0.6

## PRODUCCIÓN MASIVA DE *P. chlamydosporia* EN UN SUSTRATO SÓLIDO Y PRUEBAS DE CALIDAD

### 3.1 PRODUCCIÓN MASIVA DE *P. chlamydosporia* EN GRANOS EN UN SUSTRATO SÓLIDO

#### ***Fermentación Líquida (Hidalgo, 2000, modificado por Pérez, 2004)***

1. Se pesa el sustrato sólido a utilizar (arroz o maíz quebrado), ello en función de una cantidad de 40 g de sustrato L<sup>-1</sup> de agua destilada, esto para preparar una infusión.
2. El sustrato sólido se lava con agua potable hasta que ésta no presente una apariencia lechosa (3-4 lavados).
3. El arroz lavado se añade al agua destilada, la cual previamente se ha calentado hasta alcanzar su punto de ebullición. La infusión se deja hervir por espacio de 30 min.
4. Una vez pasado el tiempo establecido, la infusión se filtra por triple gasa y se afora al volumen de agua utilizado originalmente.
5. La infusión elaborada se esteriliza durante 20 min. a 121°C.
6. Una vez esterilizada, la infusión se deja enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se le agregan aproximadamente 5 círculos de PA+antibióticos en donde previamente ha crecido *P. chlamydosporia* (crecimiento de 15-20 días de edad a 27°C), además de los siguientes antibióticos:

sulfato de estreptomicina (50 mg L<sup>-1</sup>)

clorafenicol (50 mg L<sup>-1</sup>)

clorotetraciclina (50 mg L<sup>-1</sup>)

7. La infusión inoculada se incuba durante tres días a 28°C, manteniéndola en agitación constante (130 rpm).

### ***Fermentación Sólida (Hidalgo, 2000, modificado por Pérez, 2004)***

1. Se pesa el sustrato a usar, ello en función de una cantidad de 250 g bolsa<sup>-1</sup>.
2. El sustrato también se lava con agua potable hasta que el agua que escurra no presente apariencia lechosa (3-4 lavados).
3. El sustrato lavado se escurrir y se pone a secar a la intemperie. Para ello se debe extender sobre un cernidor y debe removerse periódicamente hasta que se adhiera sólo un poco a la mano (punto de secado).
4. Una vez alcanzado el punto de secado, el sustrato sólido se pesa conforme a la cantidad a utilizar por bolsa y se vacía en cada una de ellas.
5. Cada bolsa se sella con grapas y todas se esterilizan a 121°C por espacio de 25 min. Las bolsas se dejan enfriar durante un día.
6. Una vez transcurridos los tres días de incubación de la infusión, ésta se inocula en cada bolsa que previamente se ha revisado para verificar que se encuentre libre de contaminantes.
7. Cada bolsa se inocula con 25 ml de la infusión y se homogeniza el inoculante en el sustrato.
8. Posteriormente, las bolsas se incuban a 28°C durante 21 días (en el presente trabajo se probaron otras fechas además de ésta).
9. Transcurrido el período de incubación, las bolsas se abren y el sustrato se vierte en charolas para ponerlo a secar a 40°C durante aproximadamente 2 días.

### **3.2 PRUEBAS DE CALIDAD DEL SUSTRATO COLONIZADO (VARIABLES EVALUADAS EN LA PRODUCCIÓN MASIVA DEL HONGO)**

El primer paso se lleva al cabo a partir de los granos colonizados por el hongo, independientemente del sustrato utilizado. Para ello, se pesa un gramo de sustrato colonizado y se vierte en un tubo de ensaye con 9 ml de A-A 0.05% para obtener una

dilución  $10^{-1}$ . A partir de esta dilución, y una vez agitada la suspensión, se preparan diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  sucesivamente.

### Número de clamidosporas $g^{-1}$ de suelo

De la dilución  $10^{-3}$ , se toma una alícuota con la pipeta Pasteur y se vierte en un hematocitómetro para hacer el conteo respectivo de clamidosporas por tratamiento (Fig. 8). El conteo en el hematocitómetro se hace de las dos rejillas que presenta y luego de una serie de cálculos se obtiene el número de clamidosporas  $g^{-1}$  de producto.

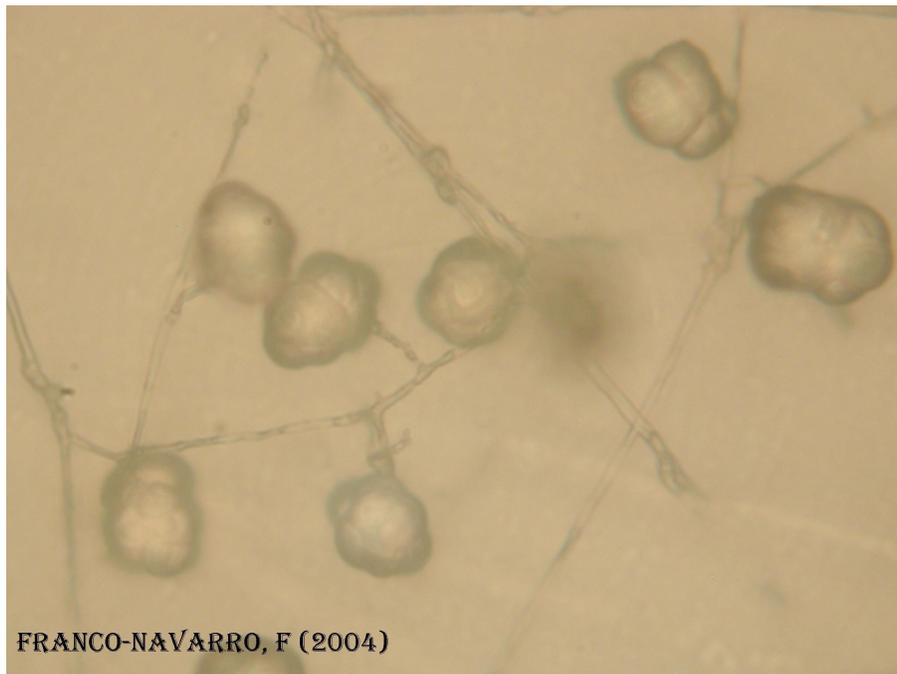


Fig. 8. Clamidosporas de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*

### Porcentaje de germinación de clamidosporas.

Esta prueba se realiza con la dilución  $10^{-2}$ , para lo cual se toma una alícuota de 0.2 ml, la cual se vacía en una caja con AA 1.5% + antibióticos y se esparce sobre el medio. La caja se incuba por espacio de 48 hrs. a  $27^{\circ}C$  y luego se identifica de entre 100 clamidosporas elegidas al azar, las que han germinado y las que no (Fig. 9). Este conteo permite estimar el porcentaje de germinación de las clamidosporas.



Fig. 9. Germinación de clamidospora de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*

#### **Número de Unidades Formadoras de Colonias g<sup>-1</sup> de sustrato**

Se parte de la dilución  $10^{-4}$ , de la cual se toman 0.2 ml que se vacían y esparcen en una caja con PA + antibióticos. La caja se incuba aproximadamente 72 hrs. a 27°C. Luego de dicho período de tiempo, se cuentan directamente las colonias presentes en toda la superficie del medio (Fig. 10), auxiliándose ya sea de una cuadrícula colocada sobre la base de la caja o bien, dibujando cuadrantes en la base de la misma.



Fig. 10. Unidades Formadoras de Colonias de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*