



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

POTENCIAL PARASÍTICO DE AISLAMIENTOS DE *Pochonia chlamydosporia* [=V.
chlamydosporium(GODDARD)] PROVENIENTES DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA
“LOS TUXTLAS”, VER. PARA EL CONTROL DE *Nacobbus aberrans* (THORNE Y
ALLEN, 1944) IN VITRO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA AGRÍCOLA

PRESENTA:

KATHIA VILCHIS MARTÍNEZ

ASESORES:

ASESOR: DRA. ROSA NAVARRETE MAYA

ASESOR EXTERNO: M.C. FRANCISCO FRANCO NAVARRO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en los art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Potencial Parasítico de Aislamientos de Pochonia chlamydosporia (=V. chlamydosporium (GODDARD) provenientes de la reserva de la biosfera "Los Tuxtlas", Ver. para el Control de Nacobbus acerrans Thorne y Allen 1944 "in Vitro"

que presenta la pasante: Kathia Vilchis Martínez
con número de cuenta: 09408977-2 para obtener el título de :
Ingeniera Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU".

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Mayo de 2010

PRESIDENTE Ing. Gustavo Ramírez Ballesteros

VOCAL M.E. Elva Martínez Holguín

SECRETARIO Dra. Rosa Navarrete Maya

PRIMER SUPLENTE M.C. Francisco Cruz Pizarro

SEGUNDO SUPLENTE M.C. Juan Roberto Guerrero Agama

AGRADECIMIENTOS

A mis padres David y Guillermina por su gran amor y apoyo incondicional, les estaré eternamente agradecida, a mi hermano Oscar por ser la persona con quien siempre puedo contar y será mi eterno cómplice, a mi hija Citlalli que me ha recordado lo feliz que es la vida además de darme la energía para salir adelante en los momentos difíciles y no puedo olvidar a mi pareja Manuel que me brindo la hermosa oportunidad de ser madre y juntos formar una familia por la que vale la pena luchar y seguir adelante.

A mis profesores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por su orientación en mi formación como profesionista y en especial a la Dra. Rosa Navarrete Maya quien me guio y apoyo para lograr mis objetivos además de impulsarme a buscar nuevos objetivos en mi vida profesional.

Al Colegio de Posgraduados especialmente al laboratorio de nematología en el Instituto de Fitosanidad por permitirme desarrollar este trabajo y adquirir experiencias enriquecedoras, resaltando el apoyo de M. C. Francisco Franco Navarro.

Finalmente al proyecto “Microbial Pest Control for Sustainable Peri-urban/Urban Agriculture in Latin America (Cuba and México).” MiCosPA (ICA4-CT-2002-10044), proyecto financiado por la Unión Europea, por el apoyo económico que me brindo para el desarrollo de esta investigación.

CONTENIDO

RESUMEN	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	7
Objetivos Específicos.....	7
Hipótesis.....	7
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
III.1 Control biológico de nematodos fitopatógenos.....	8
III.2 <i>Pochonia chlamydosporia</i>	10
III.3 El nematodo falso nodulador	19
• Control biológico de <i>Nacobbus aberrans</i>	22
IV. Zona de estudio Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas”, Veracruz.....	23
IV. MATERIALES Y METODOS	26
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
• Obtención de aislamientos positivos de <i>P. chlamydosporia</i>	31
• Parasitismo de huevos de <i>N. aberrans</i> por <i>P. chlamydosporia</i>	33
VI. CONCLUSIONES.....	43
VII. BIBLIOGRAFIA.....	44

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1 Porcentaje de cobertura vegetal.....	27
Tabla 2 Medias del porcentaje de parasitismo de los aislamientos.....	35
Tabla 3 Análisis de varianza del experimento 1.....	50
Tabla 4 Análisis de varianza del experimento 2.....	50
Tabla 5 Características de los puntos de muestreo.....	51
Fig. 1 <i>Nacobbus aberrans</i>	12
Fig. 2 Síntomas en raíz atacada por <i>N. aberrans</i>	20
Fig. 3 Localización de la zona de muestreo.....	27
Fig. 4 Crecimiento característico de <i>P. chlamydosporia</i> en caja <i>Petri</i>	29
Fig. 5 Huevo de <i>P. chlamydosporia</i> parasitado por <i>N. aberrans</i>	33
Fig. 6 Porcentaje de parasitismo de aislamientos provenientes de la selva.....	37
Fig. 7 Porcentaje de parasitismo de aislamientos provenientes de explotación agroforestal...38	
Fig. 8 Porcentaje de parasitismo de aislamientos provenientes de pastizal.....	39
Fig. 9 Porcentaje de parasitismo de aislamientos provenientes de maizal.....	40

RESUMEN

A partir de muestras de suelo provenientes de los diferentes tipos de explotación: selva, agroforestal, pastizal y maizal, de la zona de amortiguamiento de la Reserva de la Biosfera, Veracruz obtuvieron 35 aislamientos con las características del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia*, en 30 puntos de muestreo, 20 de ellos de la variedad *chlamydosporia*, 5 de *catenulata* y 5 con la combinación de ambas variedades.

Todos los aislamientos provenientes de maizal fueron de la variedad *chlamydosporia*. En cuatro de los provenientes de selva, cinco de agroforestal y uno de pastizal se identificó la variedad *catenulata*. La combinación de ambas variedades de *P. chlamydosporia* se identificaron en dos aislamientos provenientes de selva y tres en agroforestal. El total de los aislamientos fueron preservados mediante ultracongelación (-80°C), además estos fueron evaluados para conocer el potencial parasítico sobre los huevos de *Nacobbus aberrans*, utilizando cinco repeticiones con un testigo. El experimento se repitió para corroborar los resultados obtenidos.

Del total de los aislamientos mostraron parasitismo, 7 de ellos parasitaron por arriba del 80%, 13 de 70 a 79% y 11 por debajo de 70% los huevos del nematodo, esto independientemente de su procedencia.

I. INTRODUCCIÓN:

En la actualidad una de las estrategias más empleadas para el control de fitopatógenos, es el uso de químicos (Franco *et al.*, 2002); sin embargo, su costo es elevado y las restricciones de tipo ambiental incitan a su salida del mercado en el corto plazo. Ante la necesidad de atender los requisitos cada vez más estrictos respecto a la inocuidad de los alimentos por parte de los consumidores y exportadores, así como al interés por preservar el ambiente, ha sido necesario implementar alternativas de control compatibles con el ambiente y la sanidad del agroecosistema, un ejemplo de este tipo de alternativas es el control biológico (Flores-Camacho *et al.*, 2007).

Entre los fitopatógenos más importantes para la agricultura a nivel mundial y nacional se encuentran los nematodos inductores de agallas en las raíces, debido a la severidad en los daños que ocasionan y al amplio rango de cultivos que son afectados. Desde hace varias décadas se sabe que este grupo de nematodos fitopatógenos poseen enemigos naturales, entre los que destaca un grupo de hongos con la capacidad de capturar, matar y/o digerir nematodos y sus huevecillos (Barron, 1977).

Uno de los hongos nematófagos que ha recibido mayor atención en los últimos años por su potencial como agente de control biológico es *Pochonia chlamydosporia* [= *Verticillium chlamydosporium* (Goddard), Zare, Evans & Gams, 2001]; el cual es un parásito facultativo de huevos de nematodos que puede encontrarse de manera natural en suelos supresivos (Kerry, 1995).

En México se conoce poco sobre la ocurrencia de este grupo de hongos nematófagos y no ha sido sino hasta principios del siglo, que las investigaciones al respecto han tomado curso (Franco-Navarro *et al.*, 2006).

A pesar de la información generada hasta el momento, es necesario continuar la búsqueda de aislamientos nativos de la especie *P. chlamydosporia*, abarcando tanto regiones templadas como tropicales, así como suelos con diferentes grados de perturbación (desde aquellos poco o nada perturbados, hasta los destinados para uso agrícola con diferente intensidad de uso). Este tipo de estudios, sin duda alguna contribuirán a contar con una amplia gama de selección de aislamientos nativos, para de ahí obtener los que potencialmente pudieran ser utilizados como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos, principalmente aquellos que son muy dañinos para la agricultura nacional. Un caso importante en hortalizas en México es el nematodo falso nodulador, *Nacobbus aberrans*, el cual se ha detectado en diez estados de la República Mexicana, causando pérdidas significativas en la producción de cultivos como chile (*Capsicum annum L.*), jitomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*) y frijol (*Phaseolus vulgaris L.*). El jitomate es una de las hortalizas más afectadas, ya que se ha reportado que en zonas donde se produce, tanto en cielo abierto como en invernadero, las pérdidas son inclusive mayores al 80% (Franco-Navarro *et al.*, 2006).

Tomando en cuenta los elementos antes vertidos, para la realización del presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

II. OBJETIVOS E HIPOTESIS

Objetivo

Detectar la presencia del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* en la zona de amortiguamiento de la Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas”, Ver. de cuatro tipos de explotación (selva, agroforestal, pastizal y maizal) y evaluar su capacidad para parasitar huevos del nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans*.

Objetivos Específicos

- Obtener aislamientos nativos de *P. chlamydosporia* de la zona de amortiguamiento de la Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas”, Ver. de cuatro diferentes tipos de explotación (selva, agroforestal, pastizal y maizal).
- Evaluar la capacidad parasítica *in vitro* de los aislamientos obtenidos, sobre huevos del nematodo falso nodulador *N. aberrans*.

Hipótesis

De las muestras de suelo provenientes de la Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas”, Ver., de cuatro diferentes tipos de explotación (maizal, pastizal, agroforestal y selva) se obtendrá al menos un aislamiento nativo de *P. chlamydosporia*, cada uno con diferente capacidad de parasitismo en huevos de *N. aberrans*, en condiciones de laboratorio.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

III.1 Control biológico de nematodos fitopatógenos

El objetivo de la investigación respecto a los métodos de control biológico de fitopatógenos es modificar el entorno ecológico de los agentes patógenos para que éstos no tengan un ambiente favorable que les permita desarrollarse y causar daños o pérdidas que impacten de forma negativa la actividad agrícola; existen varias opciones para lograrlo: 1) la liberación regular de un número considerable de parásitos o depredadores de los organismos patógenos en la zona de interés, 2) introducción y establecimiento de depredadores en el área donde se desarrolla la enfermedad, 3) la manipulación del ecosistema para así incrementar el número de parásitos y depredadores y 4) la integración de medidas químicas y biológicas de control (Webster, 1972).

El éxito de un método de control biológico se observa no solo con la reducción de los síntomas provocados por el patógeno, sino también por una disminución de su densidad poblacional, al mantenerse ésta por debajo del nivel de daño económico (Van Driesche y Bellows, 1996).

El uso práctico del control biológico de nematodos se acentúa en circunstancias en que la población de éstos pueda ser controlada por múltiples técnicas, las cuales son capaces de contribuir a reducir la infestación de los nematodos en el suelo por efecto de competencia, depredación o parasitismo, estos organismos pueden someterse a estudios que delimiten su potencial como agentes de control biológico, tomando siempre en cuenta que deben reunir las cualidades antes mencionadas (Kerry, 1987).

Los depredadores o parásitos de nematodos fitopatógenos más estudiados han sido los hongos nematófagos, de los que se conocen alrededor de 170 especies de grupos taxonómicos muy diversos, los cuales tienen la capacidad de matar y consumir a nematodos mediante diferentes

mecanismos, ya sea como depredadores o parásitos de estadios vermiformes, ó bien parasitando quistes o huevos (Hans-Borje, 1985).

Los hongos depredadores o parásitos de estadios vermiformes atrapan a sus presas por medio de estructuras adhesivas (*Arthrobotrys oligospora*), ramificaciones adhesivas del micelio (*Monacrosporium cionopagum*), anillos constrictores (*Dactylaria brochopaga*, *A. anchonia*) y no constrictores (*Dactylaria candida*) reportadas por Barron (1977).

Todos estos organismos son saprofitos con capacidad de alimentarse de nematodos y utilizarlos como una fuente adicional de energía, encontrándose más de un tipo de estas estructuras en diferentes especies de un mismo género. Los nematodos que son presa de este grupo de hongos suelen quedar adheridos al micelio o estructura especializada según sea el caso, para posteriormente ser invadidos por las hifas a través de su cutícula hasta la cavidad corporal y formar un bulbo infectivo que sirve para absorber el contenido corporal. El nematodo muere y de su cadáver emergen hifas que esporulan ó bien producen estructuras especializadas. La sustancia adhesiva involucrada está constituida por compuestos del tipo lectina que se adhiere con sacáridos específicos a la cutícula del nematodo y suele permanecer libre de partículas de suelo y materia orgánica (Barron, 1977).

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

Estos hongos endoparásitos no desarrollan micelio en forma extensiva fuera del organismo huésped y presentan fases de resistencia cuya función es la diseminación y la supervivencia bajo condiciones adversas, un ejemplo de este tipo es *Catenaria anguillulae*, del cual las esporas flageladas se mueven siguiendo un gradiente químico originado por las secreciones del

nematodo. Otro grupo de hongos parásitos de nematodos lo conforman aquellos que presentan conidias adhesivas como es el caso de *Meritacrum asterospermum*, o las especies *Meria spp.*, *Cephalosporium spp.*, y *Pochonia spp.*, siendo este último uno de los géneros de hongos nemátofagos que han mostrado varias características que le confieren ventajas como agente potencial de control biológico de nematodos (Deacon, 1997).

III.2 *Pochonia chlamydosporia*

Pochonia chlamydosporia (Goddard) Zare y Gams (= *Verticillium chlamydosporium*), está clasificado en la clase Deuteromycetes y forma parte de la familia Hyphomycete. Es un hongo saprófito con la facultad de parasitar huevos de nematodos, por lo que se le ha considerado como un agente potencial de control biológico de nematodos formadores de agallas, (Hernández e Hidalgo-Díaz, 2008). Se consideró por primera vez a *P. chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams, antes *Verticillium chlamydosporium*, como parásito de quistes de nematodos después de aislar al hongo de huevos de *Heterodera schachtii* Schmidt y *H. avenae* Woll (Frans *et al.*, 1991). Más tarde, en el año 2000 Hidalgo *et al.* aislaron al hongo a partir de suelo proveniente de plantaciones de café, los aislamientos logrados se clasificaron por diferencias morfológicas, agrupándolos en las siguientes variedades: *V. chlamydosporium var. chlamydosporium*, *V. chlamydosporium var. catenulatum*, *V. psalliotae*, *V. suchlasporium* y un aislamiento de *V. chlamydosporium var. chlamydosporium* con un largo inusual de las clamidosporas; al realizar pruebas de parasitismo en huevos de *Meloidogyne spp.* los aislamientos de la variedad *catenulatum* arrojaron las cifras más altas en cuanto a parasitismo de huevos, colonización de raíces y producción de clamidosporas.

Hasta principios del siglo XXI *Pochonia* perteneció al género *Verticillium*, el cual es muy heterogéneo, ya que se compone de organismos con diferentes hábitos de vida desde saprófagos, fitófagos, entomófagos y, por supuesto, nematófagos; además de algunas especies que se alimentan de rotíferos e inclusive de otros hongos. Fue hasta que Zare y Gams (2001) realizaron un estudio minucioso para agrupar a los organismos ubicados en este género con criterios más naturales, el cual consistió en agrupaciones o clados; para lograrlo reunieron aislamientos de las especies involucradas, los sometieron a un análisis de cadenas cortas y largas del ADN, y definieron cuatro categorías o grupos fundamentales: en el Grupo llamado A, se agruparon especies de hábitos saprófitos que forman conidióforos erectos; en el grupo B, se colocaron especies que forman colonias de color claro y apariencia algodonosa sin presencia de clamidosporas y de hábitos entomófagos y micófagos. En el grupo C, se encontraron organismos saprófitos con conidios adhesivos y que pueden ser endoparásitos de nematodos, y finalmente en el grupo D, se reunieron organismos saprófitos capaces de colonizar huevos y quistes de nematodos (Zare y Gams, 2001)

Derivado del estudio realizado por Zare y Gams (2001), se propusieron nuevos géneros y se retomaron otros que ya estaban en desuso, entre ellos *Pochonia*, en este género se colocaron especies caracterizadas por ser parásitas de huevos y quistes de nematodos, con capacidad para formar clamidosporas típicas, de pared engrosada.

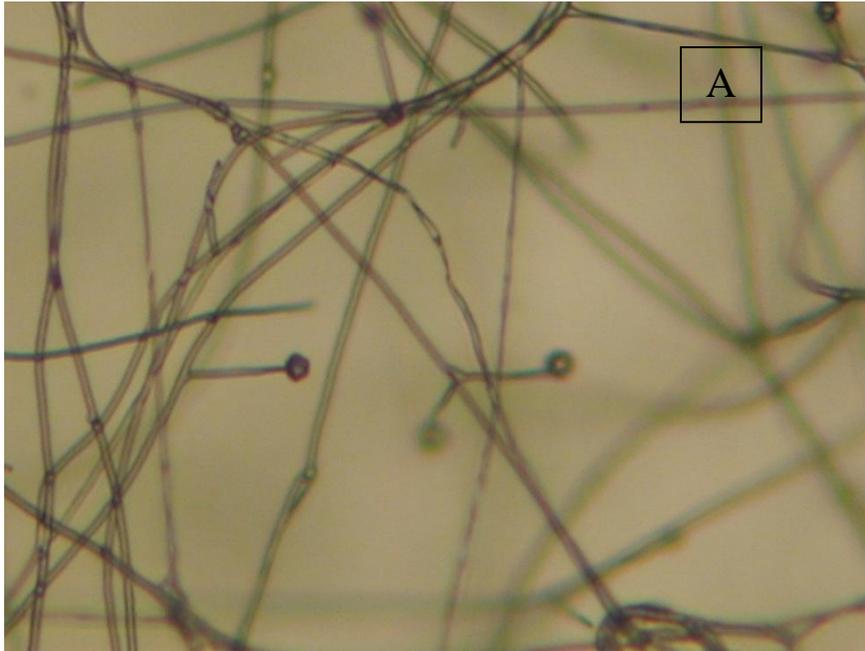
La especie más importante de este género es *Pochonia chlamydosporia*, actualmente dividida en subespecies o variedades, encontradas principalmente parasitando huevos de nematodos agalladores; estas variedades son: *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* y *P. c.* var. *catenulata*.

La diferencia principal entre ambas variedades consiste en el acomodo de las conidias sobre el conidióforo, ya que para la primera éstas forman grupos en cabezuelas, mientras que para la segunda, las conidias forman pequeñas cadenas sobre el conidióforo (Bourne *et al.*,1994).

Pochonia chlamydosporia var. *chlamydosporia*, presenta un desarrollo del micelio relativamente rápido, de 23-28mm en 10 días a 20°C en medio malta-agar. El micelio es de coloración blanca que se torna amarilla con la aparición de clamidosporas, las cuales se forman en el área del micelio; el reverso del crecimiento es amarillo, además que sus conidias se agrupan formando cabezuelas subglobosas, ovoides o elipsoidales (Fig.1:A) (Bourne *et al.*, 1994). En el caso de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, como ya se mencionó, presenta conidias agrupadas en cadena, además de que sus colonias alcanzan un diámetro de 21-24 mm en 10 días, a una temperatura de 20°C en medio malta-agar.

El micelio tiene una coloración blanca y se torna un poco amarillenta debido a la presencia de clamidosporas, el reverso de la colonia es amarillo (Fig. 1:B) (Bourne *et al.*, 1994).

Fig. 1 *Pochonia chlamydosporia*



Características biológicas

El hongo se caracteriza por tener conidióforos, los cuales generalmente son postrados y poco diferenciados del micelio, portan de 2 a 3 fiálides por nódulo en verticilo, aunque en ocasiones son sencillos, éstos soportan a las conidias, que se caracterizan por ser hialinas brillantes y unicelulares. Las conidias crecen en cabezuelas o cadenas cubiertas de una sustancia adhesiva, pueden ser desde subglobosas a elipsoidales, isodiamétricas o falcadas; producen clamidosporas en el micelio aéreo (Zare y Gams, 2001).

Las colonias de *Pochonia chlamydosporia*, en general se caracterizan por alcanzar un crecimiento en medio sólido y circular de un diámetro que va de los 15 a los 40 mm en 10 días, cuando hay aparición de clamidosporas que son estructuras de resistencia del hongo, estas aseguran su permanencia en el suelo cuando el alimento no está presente y por lo tanto contribuye a que este hongo sea un parásito eficiente, aún en ausencia de sus hospedantes (Bourne *et al.*, 1994), ya que éstas tienen la cualidad de colonizar la rizosfera sin intervenir de forma negativa o afectar el desarrollo de la planta, por lo que ayudan a prolongar la vida del hongo en el suelo y por tanto facilitar el parasitismo de agalladores y formadores de quistes.

Respecto a la forma de parasitar huevos de nematodos, en estudios realizados con microscopía electrónica se observó una especie de estructura de sujeción que se convierte posteriormente en un apresorio, el cual penetra el corion del huevo y da lugar al bulbo, propiciando la formación de redes de micelio que colonizan el huevo (Kerry, 1995). Durante este proceso de infección, *P. chlamydosporia* rompe la membrana de la superficie del huevo llamada corion, mediante la utilización de estructuras especializadas, llevándose a cabo la desintegración de la capa vitelina del corion a consecuencia de la disolución, aunque no total de la quitina y algunos lípidos.

En cuanto a la relación de la planta con el hongo, se sabe que la planta influye de manera directa ó indirecta en la cantidad de hongo a nivel de la rizosfera, ya que la planta suele presentar diferencias en su capacidad para ser colonizada por el hongo, por tanto se tiene repercusión en el grado de control de la población del nematodo, así también se ha observado que *P. chlamydosporia* es más abundante en raíces infectadas por nematodos en comparación con plantas sanas (Kerry, 2001). Existen antecedentes de experimentos en los que el crecimiento del hongo en raíces infestadas por *Meloidogyne sp.* sucede después de cinco semanas, mismas que coinciden con la aparición de las primeras masas de huevos sobre las raíces; esto crea una confusión respecto al motivo del aumento de la densidad del hongo, si se debe, ya sea a la aparición de las masas de huevos o bien a la disminución del alimento en la rizosfera (Segers *et al.*, 1994).

Otro factor que tiene influencia en la cantidad de hongo en la raíz son sus exudados, ya que estos promueven el cambio de estado saprofitico a parasítico; no hay certeza de la causa de este fenómeno, pero se cree que el exceso de carbono inhibe la producción de las enzimas dominantes implicadas en el proceso de infección. Para promover la colonización de la raíz y el crecimiento del hongo en ésta, se sabe que la adición de enmiendas orgánicas al suelo puede ayudar en gran medida al aumento de las densidades del hongo, o bien, contribuir a la disminución del parasitismo sobre los nematodos (Segers *et al.*, 1994).

La importancia de la cantidad de hongo presente en la raíz es debido a que *P. chlamydosporia* no produce estructuras especializadas de captura o infección; éste, por el contrario, posee la capacidad de parasitar al nematodo en su etapa de huevo y en ocasiones hembras sésiles, por sus estructuras adhesivas (Segers *et al.*, 1994).

***Pochonia chlamydosporia* como alternativa de control de nematodos fitopatógenos.**

Se consideró por primera vez a *P. chlamydosporia* (Goddard) como parásito de quistes de nematodos en el año de 1974, cuando Willcox y Tribe lograron aislar al hongo a partir de huevos de *Heterodera schachtii* Schmidt y *H. avenae* Woll (Frans *et al.*, 1991).

A partir de entonces se han llevado a cabo trabajos para evaluar la capacidad de *P. chlamydosporia* para controlar las poblaciones de nematodos agalladores como *Meloidogyne sp.* y *N. aberrans*, un ejemplo de ello es el trabajo de Frans *et al.* en 1991, en el que evaluó el potencial como agente de control biológico de tres aislamientos de *P. chlamydosporia* en cultivo de tomate, en condiciones de invernadero infestado con *Meloidogyne arenaria*, en donde reportó una reducción de los daños ocasionados por el nematodo, por encima del 80% a partir de la tercera generación, después de la primera aplicación del hongo.

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 o discriminar entre aquellos poco efectivos de los que potencialmente pueden explotarse a escalas más grandes y de manera comercial. Las cinco etapas mediante las cuales cualquier aislamiento de *Pochonia chlamydosporia* debe de pasar antes de su uso comercial son las siguientes (Bourne *et al.*, 1994):

- Colecta de aislamientos. Consiste en la extracción del hongo, éste puede provenir del suelo o del nematodo, posteriormente se debe cultivar libre de cualquier organismo contaminante.
- Evaluaciones en laboratorio. En este nivel se debe determinar el potencial de control biológico de cada aislamiento previamente aislado. En esta etapa se realizan pruebas de

colonización de raíces, parasitismo en huevos y la capacidad de producir clamidosporas en el sustrato de crecimiento determinado.

- Determinación de las condiciones óptimas para la producción masiva de clamidosporas; para lograrlo se pueden realizar pruebas de producción masiva en diferentes sustratos bajo condiciones estériles.
- Evaluación de los aislamientos bajo condiciones de invernadero y determinación de los factores que pudieran limitar su eficiencia en el control de nematodos.
- Los aislamientos son probados en el invernadero en diversas plantas con diferentes grados de infestación así como del hongo, todo bajo condiciones no estériles, lo más cercano a las condiciones que hay en campo.
- Evaluación de la eficiencia de los aislamientos en campo. Se aplican los tratamientos con la dosis, aislamientos efectivos etc. con mejores resultados en la etapa de invernadero, para que combinadas con otras estrategias se constituya un manejo integral del sistema. Bajo estas condiciones son importantes los monitoreos del hongo a los intervalos de tiempo previamente establecidos.

Ya se ha demostrado la capacidad de *P. chlamydosporia* para parasitar huevos de nematodos reniformes, integrando esto con otros agentes de biocontrol y algunas prácticas culturales, constituirían un excelente método de control (Kening *et al.*, 2005).

Un aspecto fundamental en el desarrollo de un agente de control biológico es la estabilidad genética del aislamiento seleccionado para la producción masiva y su aplicación.

La virulencia puede verse atenuada por subcultivos sucesivos del aislamiento, aunque hay estudios con un aislamiento de una cepa cubana de *P. chlamydosporia var. catenulata*, el cual

demonstró que no existe diferencia en el comportamiento de los subcultivos y que no hubo efecto de atenuación en la actividad enzimática (Peteira *et al.* , 2005).

El hongo nematófago *P. chlamydosporia*, es generalmente un parasito facultativo de nematodos en estadios sedentarios; está asociado a nematodos de suelos supresivos como un control natural de nematodos formadores de quistes y agallas, por tanto es considerado como un agente potencial de control biológico aplicable a suelos infestados con nematodos.

Las estrategias de biocontrol incluyen la incorporación de *P. chlamydosporia* con acciones de control cultural que permitan reducir la dependencia de nematicidas para el desarrollo del cultivar, bajo condiciones controladas se ha logrado una reducción de hasta un 85% en las poblaciones del nematodo falso-nodulador (Bourne *et al.*, 1994).

Con la información anterior, se inició la búsqueda de aislamientos nativos de México para evaluar su potencial parasítico para controlar el nematodo *Nacobbus aberrans* (Flores, 2003), se logró la obtención de cepas de *P. chlamydosporia var. chlamydosporia*, a partir de masas de huevos y suelo infestado con el nematodo *N. aberrans*, las cuales se sometieron a pruebas de parasitismo, de las que se documentaron porcentajes por arriba del 80%, estos datos dieron pie a diversos trabajos en los que se ha logrado integrar al manejo de este nematodo.

Uno de estos trabajos fue el realizado por Pérez (2004), en el que sometió estos mismos aislamientos a pruebas de colonización de raíz de plántulas de chile, documentando un porcentaje también mayor al 80%, esto al incorporar al hongo utilizando como vehículo semillas de arroz, colonizadas por *P. chlamydosporia*, y en el que concluye que estas cepas mostraron una alta capacidad de permanecer en el suelo, colonizar la raíz y parasitar huevos.

Otro estudio con estas mismas cepas fue el desarrollado por Doroteo en 2006, en el cual realizó pruebas de parasitismo en huevos de *N. aberrans*, y en esta ocasión logró un mayor porcentaje de

parasitismo que el reportado la primera vez de estos aislamientos; lo enriquecedor de este trabajo fueron las pruebas de parasitismo a partir de maíz quebrado y arroz colonizado por el hongo en base a la metodología de producción masiva original de Hidalgo *et al.* (2000) y modificada por Pérez (2004).

Así también es el caso del trabajo efectuado en las provincias Ciudad de La Habana y La Habana, en la que se presentan importantes pérdidas por *Meloidogyne sp.*, en esas áreas se aplicó el hongo ya como un producto producido de forma masiva, mezclándolo en proporción 1:10 partes con humus de lombriz producido a partir de estiércol vacuno, dentro de una secuencia de rotación de cultivos (habichuela – acelga – tomate). Al terminar el ciclo del cultivo del tomate (6 meses después de aplicado el hongo), se obtuvo una reducción de la población de nematodos en el suelo tratado y un 70% de colonización de masas presentes en las raíces; además, se logró reducir la población de juveniles de segundo estado (J2) de los nematodos (*Meloidogyne incognita*) en el suelo de forma significativa con un 68% en el primer ciclo y un 84% en el segundo ciclo del cultivo.

III.3 El nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans* (Thorne,1935) Thorne & Allen, 1944.

El nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans* es un organismo endémico de América, cuyo impacto en México ha sido bien establecido en diferentes hortalizas principalmente chile, frijol y jitomate, siendo esta última en la que más se han enfocado los estudios, debido a que es considerada económicamente como la más importante por su rentabilidad, demanda de mano de obra, rendimiento y relevancia como producto de exportación (Hernández, 2001).

En el estado de Hidalgo, se ha optado por el abandono del cultivo de jitomate debido a la presencia de este nematodo y en el caso de Tecamachalco, Pue., las pérdidas en campo se han establecido entre un 50 y un 70% (Cristóbal, 2000).

Cristóbal (2000), trabajando con tres condiciones de manejo en un predio naturalmente infestado con *N. aberrans*, estimó las pérdidas de producción de jitomate en un 12%, bajo un esquema de control integrado, en un 29% empleando prácticas agronómicas regionales y de 83% cuando no se realizó ningún control. En frijol, Silva (1989) estimó que este nematodo puede reducir el rendimiento entre 18% y 32% en la variedad Negro Puebla y del 18 al 36% en la variedad Canario.

Este nematodo se reporta en México por primera vez en raíces de chile en 1967 por Brunner, actualmente se reporta como patógeno de otros cultivos de importancia económica como son: jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), espinaca (*Spinacea oleracea* L.), acelga (*Beta vulgaris* L.) y amaranto (*Amaranthus hybridus* L.) (Manzanilla *et al.*, 2002).

Sintomatología

Generalmente, las plantas infestadas por *N. aberrans*, no tienen el crecimiento normal en la parte apical y tienden a marchitarse cuando hay deficiencia de humedad; las hojas pueden presentar clorosis y las plantas pueden achaparrarse, además de manifestarse caída de flores y frutos y en consecuencia la reducción en el rendimiento (Manzanilla *et al.*, 2002).

Los síntomas en las raíces, son la presencia de agallas así como la ausencia de raíces terciarias y fibrosas (Fig.2); es común que se le llame a este síntoma “rosario”, por la disposición que tienen las agallas en la raíz.

El tamaño y forma de las agallas ocasionadas por *Nacobbus* son generalmente esféricas, similares a las ocasionadas por las especies de *Meloidogyne*, además las raíces laterales carecen de extensiones (Manzanilla *et al.* 2002).

Fig. 2 Síntomas en raíz atacada por *N. aberrans*



Nacobbus aberrans posee un amplio rango de hospedantes, es capaz de sobrevivir bajo condiciones adversas aun en ausencia del hospedante y se adapta a diferentes condiciones ambientales que pueden ir desde templadas hasta muy frías, en un rango de actividad desde los 500 hasta los 4500 msnm (Zamudio, 1987), tiene un alta capacidad reproductiva, de ahí que este nematodo se ha convertido en una plaga importante y difícil de controlar, principalmente si se acude a una sola alternativa.

Morfológicamente *N. aberrans* se caracteriza porque las hembras tienen un solo ovario, en sus estadios juveniles es vermiforme y móvil, tanto en raíces como en el suelo (Sher, 1969); al establecerse dentro de las raíces inducen la formación de agallas, de ahí el nombre de “falso

nodulador”, esto debido a que las agallas son similares a las producidas por el nematodo *Meloidogyne* spp. (Cid del Prado, 1983).

Importancia económica

Los daños que causa, principalmente en los cultivos de jitomate, frijol y chile, son cuantiosos al reducir de forma importante su rendimiento; en un predio cultivado con jitomate e infestado con *Nacobbus aberrans* en Río Grande, Zac. hubo pérdidas de 12% bajo un control integrado, 29% aplicando las labores culturales de la región y 83% sin realizar ningún control, (Cristóbal, 2000).

Esta especie de nematodo se ha encontrado en diez estados de la República Mexicana, siendo el jitomate uno de los hospedantes más afectados. Del total de poblaciones reportadas en el país, únicamente en Melchor Ocampo (Gto.) y Zacatecas (Zac.) no afectan a este cultivo (Flores-Camacho *et al.*, 2007).

Control biológico de *N. aberrans*

Se conoce una gran variedad de enemigos naturales que pueden reducir en menor o mayor grado las poblaciones de los nematodos fitopatógenos, entre los que se encuentran algunos virus, bacterias, ácaros, tardígrados, nematodos depredadores y hongos, siendo este último uno de los grupos más estudiados y el que más se ha considerado como una alternativa viable y con mucho potencial para el control biológico de nematodos fitopatógenos, principalmente los formadores de agallas (Rodríguez-Kabana, 1991)

Los hongos biorreguladores promisorios para el control de nematodos agalladores y formadores de quistes, pertenecen al los géneros *Paecilomyces* Bainer y *Pochonia* (= *Verticillium*) Ness (Rodríguez-Kabana, 1991).

Por los antecedentes como un agente potencial de control biológico de nematodos agalladores y en los actuales aislamientos mexicanos logrados de *P. chlamydosporia*, además de las cifras promisorias que arrojaron los estudios previos a este trabajo, (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007), fue de mucha importancia iniciar la búsqueda de nuevos aislamientos de este hongo para contribuir con alternativas de control para nematodos agalladores, por lo que derivado de un estudio de diversidad de nematodos en la Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas”, Veracruz, se procedió a la búsqueda de aislamientos del hongo *P. chlamydosporia*.

IV. Zona de estudio Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas”, Veracruz.

La Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas” se localiza en el estado de Veracruz, en la Planicie Costera del Golfo de México. Forma parte de la selva húmeda neotropical y se caracteriza por la notable diversidad vegetal y animal, así como por ser el límite boreal extremo de la selva húmeda neotropical en el Continente Americano (Zaragoza, 1997).

Abarca parte de los municipios Angel R. Cabada, Santiago Tuxtla, San Andrés Tuxtla, Catemaco, Sotepan, Mecayapan, Tatahuicapan de Juárez y Pajapan. Los límites del área protegida son: al este de la costa del Golfo de México en Punta Puntillas, al norte el Lago Catemaco y al sureste la zona Federal Marítimo Terrestre, en la costa del Golfo de México (SEMARNAP, 1998).

La región de Los Tuxtlas posee una enorme biodiversidad y ésta se debe a su ubicación geográfica en medio de la Planicie Costera y cerca al mar, a la amplitud de su gradiente de altitud, al terreno escarpado y a su posición con respecto a los vientos húmedos provenientes del Golfo de México. Se pueden identificar hasta 9 tipos de vegetación. Los estudios de la flora han registrado 2,695 especies de plantas, los estudios sobre la fauna han reportado unas 561 especies de aves, algunas descritas como poco comunes debido al aislamiento ecológico y factores ambientales de

la región. Los mamíferos están representados por 139 especies, los reptiles con 120 especies y los anfibios con 46 especies (Martínez-Gallardo y Sánchez-Cordero, 1997).

También hay 531 especies de mariposas, 23 especies y 10 géneros de abejas sin aguijón, 133 especies de libélulas, 118 especies de coleópteros cerambícidos, 164 especies de escarabajos y más de 50 especies de insectos acuáticos (Rzendowski, 1986).

La reserva cuenta con un programa de manejo cuyos componentes son: 1) protección y conservación ecológica; 2) investigación y monitoreo; 3) conservación de suelos, mejoramiento agrícola, agroforestal y uso de sistemas solares domésticos; 4) educación ambiental, divulgación y capacitación, y 5) administración.

Por otro lado, la reserva cuenta también con una zona de amortiguamiento, la cual se divide en subzonas de manejo (SEMARNAT-RBLT 2001) que se indican a continuación:

A) La subzona de uso tradicional que se encuentra estrechamente relacionada con la distribución del grupo étnico Popoloca, que habitan varios de los ejidos más antiguos de la región.

B) La subzona de uso tradicional, habitada por indígenas Popolocas también representa el área de producción cafetalera, y de formas tradicionales de aprovechamiento de los recursos (milpas, cafetal rústico, recolección, caza y pesca), las mismas que han contribuido a la conservación óptima de los ecosistemas. Además estos indígenas Popolocas han satisfecho sus necesidades socioeconómicas y culturales, sin romper con la estructura de los ecosistemas con que se relacionan.

C) La subzona de aprovechamiento sustentable de los recursos naturales, en la que se realizan actividades agropecuarias y pesqueras, en terrenos donde hay remanentes de selvas, bosques o acahuales. La intención en esta zona de manejo es el mejoramiento y diversificación de

tecnologías que posibiliten el mantenimiento o mejoramiento de la producción, sin degradar los recursos naturales.

La función ecológica y social de esta área es la amortiguación de los impactos y de la presión originada por las actividades humanas ejercidas sobre las zonas núcleo. Otra función es reforzar los corredores biológicos para formar conexiones ecológicas entre las áreas forestales de las partes altas de los volcanes con las partes bajas de la sierra, hacia los litorales y la rivera del Lago de Catemaco.

Los manglares de la Laguna de Sontecomapan también forman parte de esta subzona, debido a sus características ecológicas intrínsecas y a los beneficios ambientales y sociales que ofrecen.

D) La subzona de aprovechamiento sustentable de agroecosistemas integra las áreas de los terrenos en los que existe un desarrollo intensivo de las actividades agropecuarias. Los fragmentos o acahuals de selvas o bosques están ausentes o son poco significativos. El objetivo de esta zona de manejo es que los sistemas productivos se mantengan a través de la innovación y adopción de tecnologías que no deterioren o contaminen los recursos naturales.

E) La subzona de recuperación tiene asignadas áreas que corresponden a laderas con pendientes muy fuertes, que han sido ocupadas por la ganadería. En éstas se propone impulsar la recuperación de estas áreas de fuerte pendiente, mediante proyectos de reforestación.

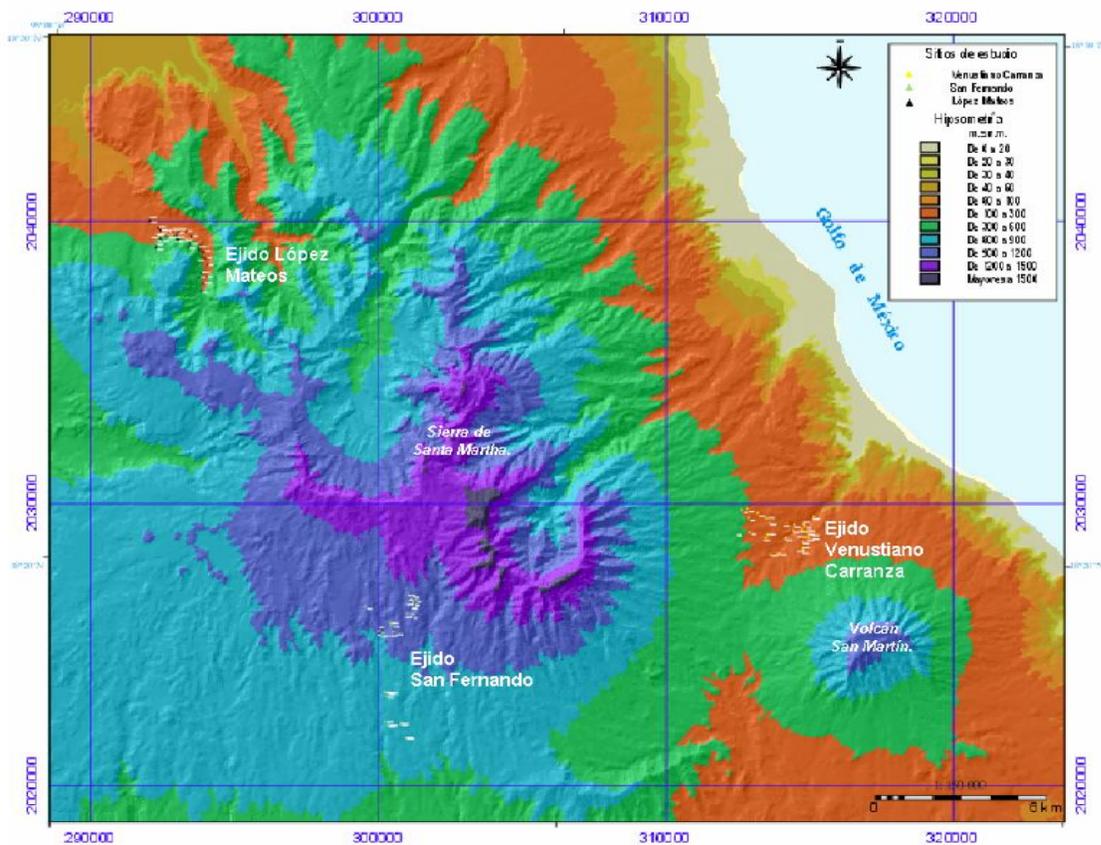
I. MATERIALES Y METODOS

Búsqueda de aislamientos nativos en suelos dentro de la zona de amortiguamiento de la Reserva “Los Tuxtlas”

- **Colecta de muestras de suelo.**

El muestreo se realizó en la zona de amortiguamiento, dentro de la reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas”, Veracruz, en los ejidos: López Mateos (Mpio. de Catemaco), Venustiano Carranza (Mpio. de Tatahuicapan) y San Fernando (Mpio. de Soteapan) (Fig.2), todos ellos comprendidos en zona de amortiguamiento, y con diferente porcentaje de cobertura vegetal entre ellos (Tabla 1).

Fig. 1 Localización de la zona de muestreo



Mapa aritmético 1:150,000 de la Sierra de “Los Tuxtlas”: Volcanes San Martín y Santa Martha. (Ríos, 2006).

Tabla 1 Porcentaje de cobertura vegetal

EJIDO	López Mateos	San Fernando	Venustiano Carranza
Cobertura vegetal	75%	50%	25%

(Rzendowski, 1986) Fuente: Ríos, 2006

Se siguió un patrón de muestreo de 200 m de distancia entre los puntos, asegurándose de que no hubiera dependencia entre ellos; los puntos de muestreo se trazaron formando una red de líneas cruzada para formar nueve submuestras (de 100 g cada una), a una profundidad de 10 a 30 cm.

Se trazaron dos círculos concéntricos alrededor de cada punto y cuatro submuestras fueron tomadas en el interior de cada círculo (3 cm de diámetro) y otras cuatro de fuera de los círculos (6 cm de diámetro). Las submuestras fueron mezcladas en bolsas de plástico obteniendo un total de 106 bolsas. De las bolsas se tomaron 50 g para determinar: contenido de materia orgánica, humedad y pH que fueron analizados por el Instituto de Ecología en Xalapa, Veracruz.

- **Aislamiento del hongo**

Con el fin de obtener aislamientos nativos de los suelos muestreados, las muestras se procesaron de acuerdo con el protocolo descrito por Pérez (2004).

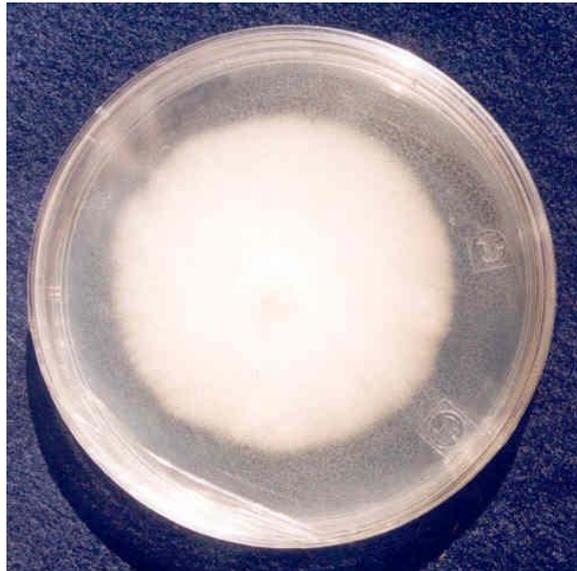
Una vez que se detectaron colonias, que por sus características de crecimiento en medio semiselectivo sugerían ser de *Pochonia*, se transfirieron a medio Papa-Agar (PA) + antibióticos, con el fin de observar el crecimiento característico de la colonia.

Una vez transcurridos 10 días de incubación, las cajas fueron observadas bajo un microscopio compuesto Ilustracto American Optical© a un aumento de 40X para determinar sus estructuras características (micelio, conidióforos y conidios).

Las cajas se monitorearon hasta que se observó la aparición de las esporas de resistencia llamadas clamidosporas.

Una vez que se determinó que las colonias pertenecían a *P. chlamydosporia* y dentro de ella a la variedad *chlamydosporia*, se realizaron transferencias en cajas limpias (Fig. 4) con el fin de purificar el aislamiento y posteriormente preservarlo tanto en aceite mineral estéril a base de PA + antibióticos, como a bajas temperaturas (ultracongelación). En ambos casos se preservaron aislamientos purificados con 21 días de edad.

Fig. 2 Crecimiento característico de *P. chlamydosporia* en caja Petri



En el caso de la preservación en ultracongelación, a la caja con el aislamiento purificado se le agregó glicerina al 5% esterilizada y se realizó un raspado con una varilla de vidrio para desprender las estructuras del hongo (conidios y clamidosporas); la suspensión se colocó en pequeños tubos de plástico que se depositaron en un ultracongelador a -80°C , el cual pertenece a la Colección de hongos del Colegio de Postgraduados.

- **Parasitismo de huevos de *N. aberrans***

Para llevar a cabo esta prueba se emplearon dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* y var. *catenulata* obtenidos de los suelos muestreados dentro de La Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas”. Todos los aislamientos se mantuvieron por 21 días en cajas Petri con PA + antibióticos y se probaron sobre huevos de una población de *N. aberrans* proveniente de una cría en invernadero de la localidad de Montecillo, Estado de México.

La preparación del inóculo de *P. chlamydosporia*, la extracción de huevos de *N. aberrans*, el establecimiento y evaluación del experimento se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Doroteo (2006) (Ver anexo Tabla 5).

El trabajo de las pruebas de parasitismo se realizó por duplicado con el fin de corroborar los datos obtenidos.

- **Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos de las variables de respuesta de las diferentes pruebas realizadas fueron sometidos a un análisis de varianza y a la prueba de comparación de medias ortogonales de Tukey ($\alpha=0.05$) (SAS, 2005), en donde se utilizaron 35 tratamientos cada uno con 5 repeticiones y como unidad experimental una caja Petri de 10X15 mm.

I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Obtención de aislamientos positivos de *Pochonia chlamydosporia*.**

A partir de las muestras de suelo provenientes de la zona de amortiguamiento de la Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas”, de los diferentes tipos de explotación, se obtuvieron 35 aislamientos con las características del hongo nematofago *P. chlamydosporia* en 30 de los puntos de muestreo, 20 de ellos de la variedad *chlamydosporia*, 5 de *catenulata* y 5 con la combinación de ambas variedades.

De los 35 aislamientos, 12 provinieron del tipo de explotación forestal, 13 del agroforestal, 6 del pastizal y 4 del maizal (Ver anexos Tabla 5).

Todos los aislamientos provenientes de maizal fueron de la variedad *chlamydosporia*. En 4 de los de selva, 5 de agroforestal y 1 de pastizal se identificó la variedad *catenulata*.

Ambas variedades de *P. chlamydosporia* se identificaron en 2 aislamientos provenientes de selva y 3 en agroforestal.

Analizando las características de los puntos de muestreo, los cambios más drásticos en los indicadores de degradación considerados, ocurrieron en el maizal; muestran que la actividad antropogénica tiene influencia en la reducción en la calidad del suelo y acelera la degradación de éste (Ríos, 2006).

En regiones que son las más representativas, seleccionándose cuatro tipos de explotación: maizal, pastizal, agroforestal y selva, dependiendo del cambio de uso de suelo, se presentan diferentes efectos en las propiedades físicas y biológicas. Por ejemplo, a lo largo del tiempo la materia orgánica se va perdiendo en un sistema agrícola bajo laboreo continuo (maizal), pero en sitios con vegetación continua (sistemas agroforestales y pastizales) se mantienen las condiciones de

carbono orgánico del suelo y no así, la densidad aparente y el porcentaje de porosidad. El porcentaje de cobertura vegetal actual en estos ejidos es claro reflejo de cómo las selvas tropicales han sido destruidas de manera extensiva en el país (Tabla 2) (Ríos, 2006).

Esto hace notar que en ambientes menos alterados hay mayor posibilidad de encontrar organismos benéficos, ya que hay mayor diversidad.

Otro dato importante a considerar es que en el estudio para determinar las especies de nematodos presentes en estos mismos puntos no se reportó la presencia de *N. aberrans* aunque en tres puntos de la localidad San Fernando y uno de López Mateos se registró la presencia de *Meloydogine sp.*, nematodo fitoparásito que también es parasitado por *P. chlamydosporia*, esto es un indicador importante, puesto que esto podría deberse ya sea a que la presencia de *P. chlamydosporia* inhibe la proliferación de nematodos agalladores o bien, a que cuando la diversidad de organismos es alta, la presencia de fitopatógenos disminuye debido a que en ambientes naturales las poblaciones se auto-regulan y coevolucionan (comunicación personal Franco-Navarro, 2009).

Es muy importante recalcar que en este trabajo se contribuyó con los primeros reportes en México de la presencia de *P. chlamydosporia var. catenulata* estando en 14 puntos de muestreo, ya sea solo o combinado, así como de la presencia de *P. chlamydosporia var. chlamydosporia* en suelos no perturbados de nuestro país, siendo por tanto los ambientes poco o nulamente perturbados, fuente importante de organismos con potencial de control biológico y muestra de la importancia de la conservación de estos recursos.

Además de destacar la importancia de conservar la riqueza de nuestros suelos y en general el ambiente, no solo como una fuente de obtención de organismos benéficos, sino mantener una biodiversidad que pueda autorregularse.

- **Parasitismo de huevos de *N. aberrans* por *P. chlamydosporia*.**

Se evaluaron un total de 35 tratamientos, obteniendo diferencias significativas entre los aislamientos respecto a su capacidad parasítica, de acuerdo al análisis de varianza aplicado (Tukey, $\alpha=0.05$) en ambos experimentos, con una f calculada= 23.08, $Gl=120$ y $Pr<0.001$ en el primero (Ver anexos: Tabla 3) y f calculada= 67.57, $Gl=120$ y $Pr=<0.001$ en el segundo (Ver anexos: Tabla 4), ya que valor de f calculada en ambos experimentos rebasa al valor crítico que es de 3.354 la probabilidad demuestra a qué nivel los resultados son estadísticamente significativos

Del total de los aislamientos, 7 de ellos parasitaron por arriba del 80%, 13 de un 70 a 79% y 11 por debajo de 70% de los huevos de *N. aberrans*, independientemente de su procedencia (Tabla 2), intervalos en los cuales se tomaron como antecedentes los trabajos previos, un ejemplo de ello fue en el que Hidalgo (2000) obtuvo porcentajes de parasitismo en pruebas realizadas utilizando huevos de *Meloidogyne incognita* entre 53 y 73% para aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

Además de los aislamientos mexicanos obtenidos por Flores (2003) de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* procedentes de suelos infestados con *N. aberrans*, confrontados a huevos de este mismo, y procedentes de la localidad Montecillo, Texcoco Estado de México y Tecamachalco, Puebla, en el que en pruebas de parasitismo en huevos a nivel “*in vitro*” logró resultados de un 76 hasta 96%; además, Pérez-Rodríguez *et al.* (2007) evaluaron estos mismos aislamientos, en los que registraron resultados de 77.2 y 89% al usar como fuente de inóculo placas de papa-agar y un 87% al usar arroz colonizado por el hongo; por lo que se consideró prudente tomar un rango de parasitismo por encima del 80% como favorable para continuar con las evaluaciones que confirmen el potencial de estos aislamientos como control biológico de *N. aberrans*.

Con esta información, se observa que aunque estamos hablando de una sola especie de hongo, entre aislamientos puede haber variabilidad en la capacidad de parasitar huevos del nematodo (Fig. 5), ya sea por variabilidad genética o bien por los cambios grandes o pequeños que hay en su entorno natural.

Fig. 1 Huevo de *N. aberrans* parasitado por *P. chlamydosporia*



Tabla 1 Medias del porcentaje de parasitismo de los aislamientos

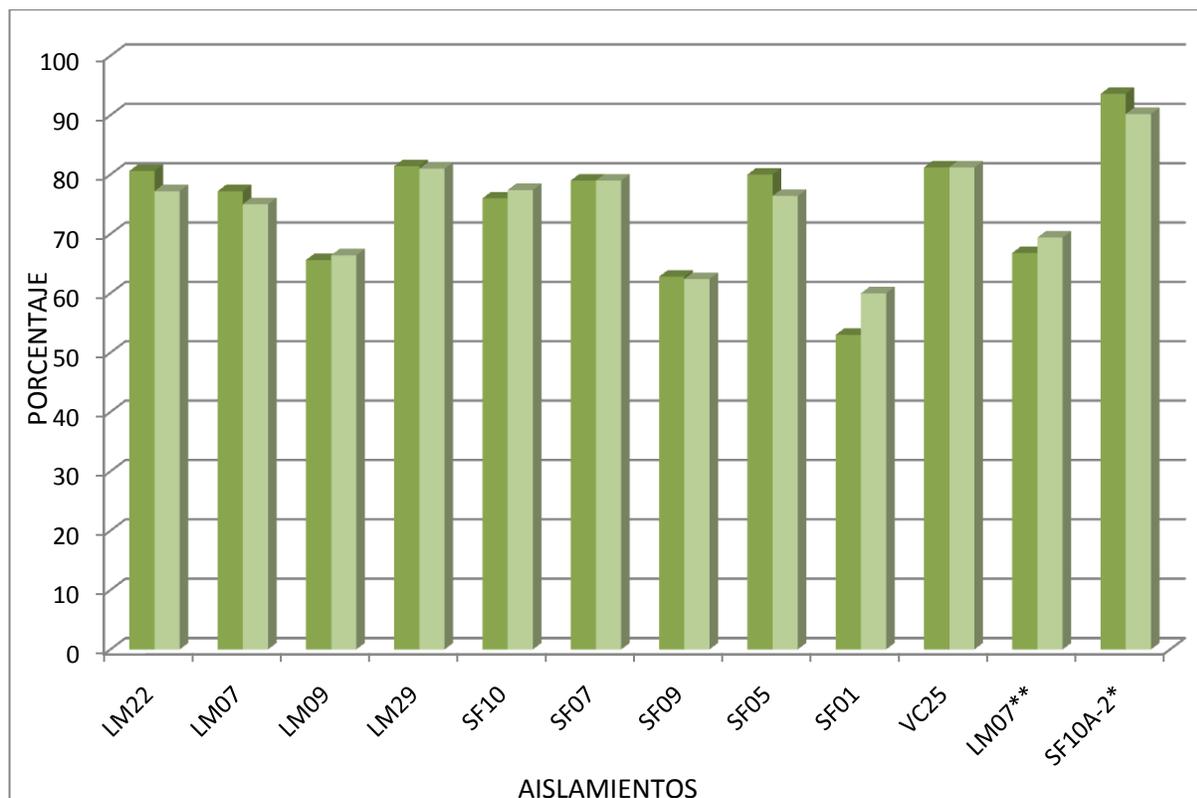
AISLAMIENTO	Media Experimento 1	Media Experimento 2	Promedio	GM
SF10A-2*	93.6	90.2	91.9	a
LM37	85	85.6	85.3	a
LM13*	85.4	84.4	84.9	a
LM17**	70.6	96.2	83.4	a
LM15	84	82.6	83.3	a
VC25*	81.2	81.2	81.2	a
LM29	81.4	81	81.2	a
LM34	81.6	80	80.8	a
LM18	81.4	79.8	80.6	a
SF05	77.2	81.8	79.5	a
SF07	79	79	79	a
LM22*	80.6	77.2	78.9	a
LM01	79.6	78	78.8	a
SF05	80	76.4	78.2	a
LM05	78	78.2	78.1	ab
SF11	77.8	78.2	78	ab
SF16	81	72.6	76.8	ab
SF10**	76	77.4	76.7	a
LM36	78.6	74.2	76.4	a
LM07	77.2	75	76.1	a
LM06	74.8	76.4	75.6	ab
SF15P	69.8	80	74.9	b
SF11**	81.6	68	74.8	ab
LM16	69.6	70.6	70.1	b
LM05**	74.6	64.4	69.5	b
LM17	70.2	66.8	68.5	b
LM07**	66.8	69.4	68.1	ab
SF19	67.4	67.8	67.6	b
LM25	68	66.2	67.1	ab
LM09	65.6	66.4	66	ab
SF15*	65.6	65.2	65.4	b
LM11	61.6	63.8	62.7	b
SF09	62.8	62.4	62.6	ab
SF01	53	60	56.5	b
SF10*	57.8	50.2	54	ab

* Aislamientos de variedad *catenulata*. ** Ambas variedades (*catenulata* y *chlamydosporia*), GM: Grupos de medias según Tukey $\alpha= 0.05$; casillas con la misma letra no muestran diferencias estadísticas significativas. La comparación de medias se llevo a cabo con las medias totales.

Como se puede observar en este estudio, la totalidad de los aislamientos presentaron algún porcentaje de parasitismo, además de mostrar una rápida y agresiva infección a los huevos que se encontraban en su fase embrionaria, no así cuando los huevos presentaban una fase más avanzada de su desarrollo (fase larvaria), como lo documentó Kerry (1995). También se puede observar que en los tratamientos SF11, SF16 y LM17 hay diferencia importante entre el experimento 1 y 2, se le puede atribuir esto a una posible dependencia de factores abióticos, para estudios posteriores propongo el incremento de las repeticiones y así disminuir el error.

De los aislamientos procedentes de la selva, que es el área de muestreo menos alterada, se obtuvieron porcentajes de parasitismo muy variados (Fig.6), algunos superaron el 80% como son el VC25 y el SF10A-2 que son de la variedad *catenulata*, también el LM29 de la variedad *chlamydosporia*, observando con esto que ambas variedades tienen la capacidad de parasitar a los huevos del nematodo de manera similar. Otra cuestión, que también vale la pena recalcar es que hubo, aislamientos que solo parasitaron por debajo del 60%; esto lleva a pensar que el potencial parasítico no está en función de su procedencia ni de la variedad en cuestión sino a otros factores que sería muy interesante conocer.

Fig. 2 Porcentaje de parasitismo de aislamientos provenientes de la selva



** Aislamiento con combinación de ambas variedades: *chlamydosporia* y *catenulata*.

* *P. chlamydosporia* var. *catenulata*.

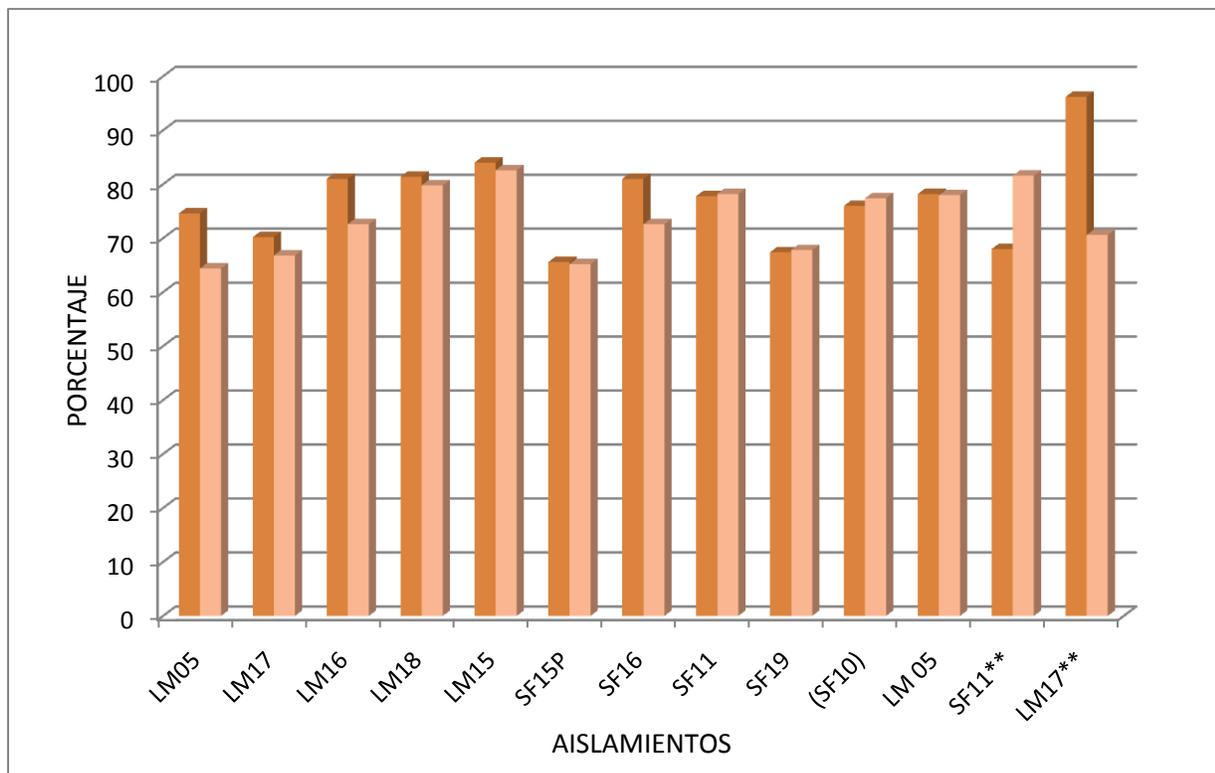
Otro de los tipos de explotación donde se obtuvo un número considerable de aislamientos fue del sistema agroforestal, que aunque es un ambiente en el que ya hay una actividad antropocéntrica, provienen de una zona con la categoría Reserva de la Biosfera, por lo que hay programas para explotar los recursos naturales de manera racional y sustentable, por eso, considero que la riqueza en la biodiversidad aún no ha sido gravemente alterada o bien, está en recuperación. A esto atribuyo el número de aislamientos, pero no el potencial parasítico de cada uno de ellos, ya que como en los precedentes de la selva el potencial parasítico es variable (fig. 7), como se dijo antes podría deberse a que a algunos aislamientos les afecta en mayor medida factores no especificados en este trabajo. Ejemplo muy evidente de esta variación es la que se dio de un experimento a otro en los aislamientos LM17 y SF10 que en la segunda repetición del experimento superaron el 90% de parasitismo, esto llevaría a realizar nuevas pruebas para conocer la causa de la variación, ya

que en el caso de elegir el mejor aislamiento para pruebas posteriores habría dudas por una posible inestabilidad del aislamiento.

También puedo pensar que el potencial parasítico de los aislamientos está en función del punto de muestreo, ya que no debemos olvidar que aunque estamos hablando solo de dos organismos que son el hongo y el nematodo, en condiciones naturales ambos estarían rodeados de un gran número de microorganismos que influyen su biología y fisiología, como mencionó Gleason en 1926 ... “las comunidades están conformadas por poblaciones con arreglos aleatorios, producto de los patrones de distribución de cada especie”... (Maass y Martínez-Yrizar, 1990).

También debo hacer notar que dentro de los aislamientos que muestran mayor parasitismo se encuentran SF11 y LM17 en los que tenemos combinación de ambas variedades de *P. chlamydosporia*.

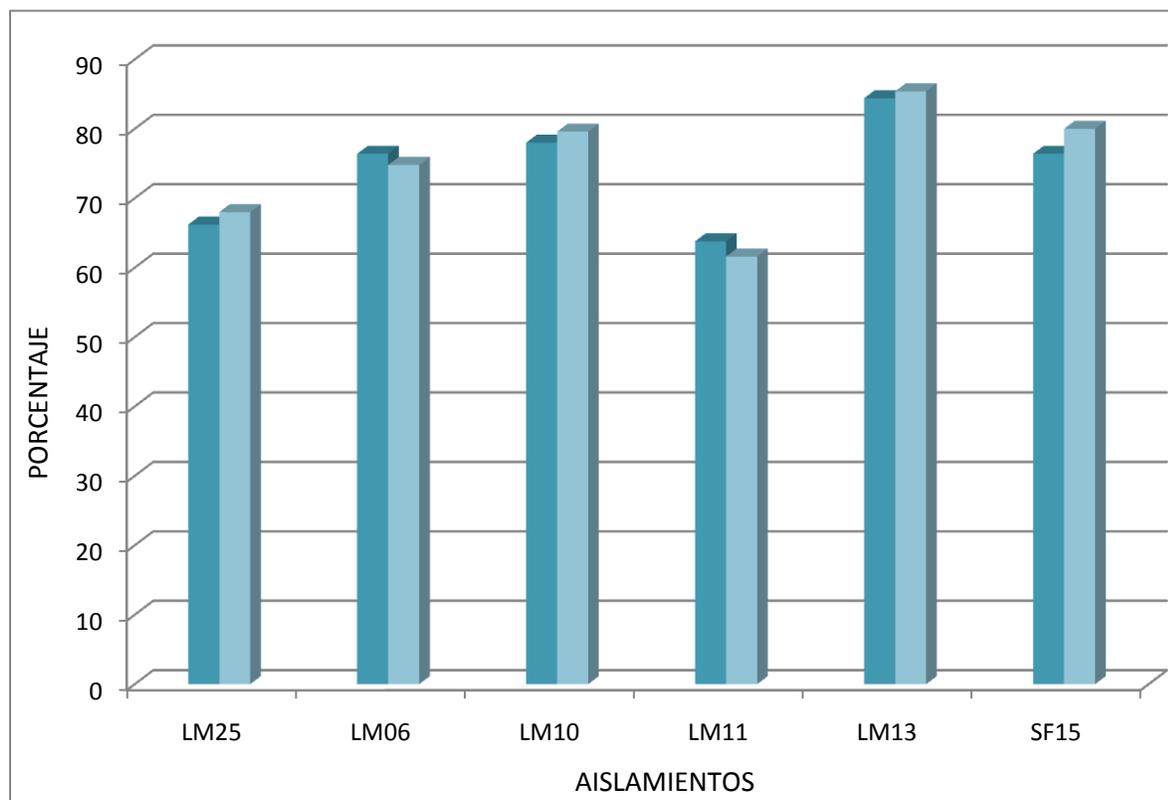
Fig. 3 Porcentaje de parasitismo de aislamientos provenientes de explotación agroforestal



** aislamiento con combinación de ambas variedades: *chlamydosporia* y *catenulata*.

Los aislamientos procedentes del pastizal, a demás de ser menos en número, solo uno de ellos superó el 80% de parasitismo y en todos ellos se observó mayor estabilidad de un experimento a otro (Fig. 8).

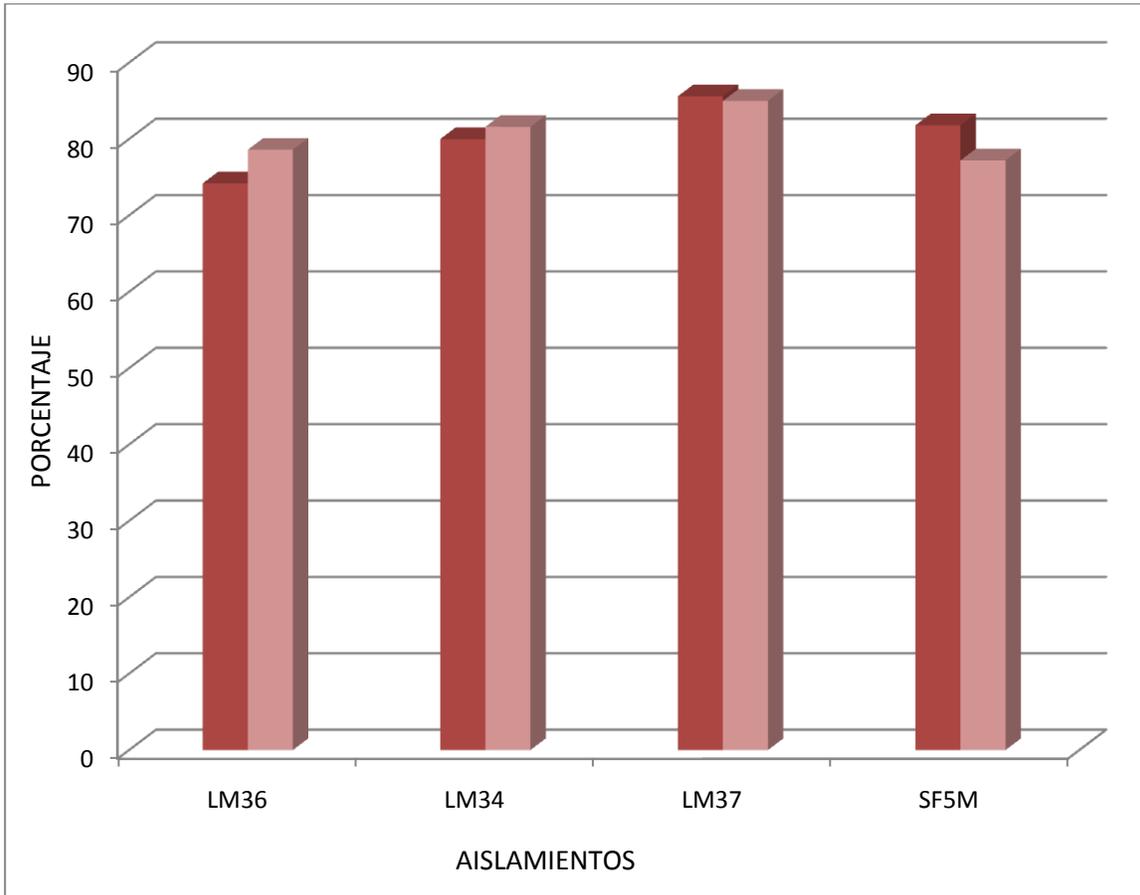
Fig. 4 Porcentaje de parasitismo de aislamientos provenientes de pastizal



Aún menor fue el número de aislamientos provenientes del maizal, lo que confirma que en ambientes muy alterados la probabilidad de obtener aislamientos de este hongo benéfico es menor. Respecto al parasitismo observado, todos los aislamientos lo hicieron por arriba del 70% (Fig.9) destacándose el LM37 que lo hizo por arriba del 80%.

Tanto en pastizal como en maizal hubo menos diferencias entre tratamientos en el porcentaje de parasitismo que en los dos ambientes que están menos alterados, aunque podría deberse solo a que hay menor posibilidad de variabilidad entre aislamientos por el número de ellos.

Fig. 5 Porcentaje de parasitismo de aislamientos provenientes de maizal



De lo anterior podemos decir que los aislamientos de *Pochonia chlamydosporia* provenientes de “Los Tuxtlas”, Ver., cumplen con la primera de cinco etapas de evaluación mediante las cuales cualquier aislamiento debe pasar antes de su producción masiva para uso comercial (Bourne *et al.*, 1994). Además, considero que cumple con las características de un agente de control biológico tanto para *N. aberrans* como otros nematodos agalladores, y por tanto recomiendo continuar las evaluaciones necesarias hasta lograr que por lo menos un aislamiento de los obtenidos en este trabajo pueda explotarse a gran escala, y concluir en un producto potencialmente comercial que ayude a solucionar problemas con nematodos agalladores en diversos cultivos.

De ahí que los porcentajes de parasitismo de los aislamientos logrados en este trabajo y los antecedentes con este hongo, motivan a continuar con los estudios necesarios que confirmen a éstos como un agente potencial de control biológico de *N. aberrans*, idealmente, hasta llegar a la obtención de un producto comercial adecuado para las condiciones de nuestro país y cultivos con problemas por nematodos.

Teniendo como antecedente el trabajo de Hernández e Hidalgo (2008) en el que se evaluó la efectividad del hongo *P. chlamydosporia* var. *catenulata* comprobando que su efectividad aumenta con el tiempo, ya que a partir del segundo ciclo del cultivo, aumenta su población en el suelo, y por tanto, mejora paulatinamente su acción biorreguladora, considero muy importante buscar su permanencia en el suelo tal vez con el enriquecimiento nutrimental del suelo y así esperar resultados mejores a mediano y largo plazo.

Respecto a la velocidad de la colonización del hongo sobre el huevo, posterior al momento de la inoculación y durante el tiempo de incubación, se llevaron a cabo revisiones periódicas para corroborar el inicio en el crecimiento del hongo; durante estas revisiones se observó que a partir de dos días de inoculación con *P. c. var. catenulata* sobre los huevos, se mostró el inicio de la colonización, a diferencia de los inoculados con la variedad *P. c. chlamydosporia*, por lo que considero importante estudiar las diferencias en la patogenicidad de ambos, proponiendo como una variable el tiempo al inicio de la colonización, tomando en cuenta la importancia del tiempo como una posibilidad para hacer más eficiente el control al inmovilizar al nematodo e impedir la eclosión del huevo.

Este documento da pauta para seguir adelante con las evaluaciones consecutivas y contribuir finalmente con una alternativa de control de *N. aberrans* que sea amigable con el medio ambiente y además disminuir las pérdidas a los cultivos ocasionadas por este patógeno.

Finalmente el total de los aislamientos se procesaron para lograr su preservación, el método que se utilizó fue la ultracongelación (-80°C), ya que la determinación del método adecuado de preservación y el monitoreo periódico para el cotejo de su morfología, patogenicidad y estabilidad genética es imprescindible para el éxito en el desarrollo de un producto comercial y constituye actualmente un requerimiento para el registro de un Agente de Control Biológico (Peteira *et al.*, 2005).

VI. CONCLUSIONES

- Es posible obtener aislamientos del hongo *Pochonia chlamydosporia* a partir de suelo proveniente de “Los Tuxtlas”, Ver.
- Hay la posibilidad de obtener aislamientos de *P. chlamydosporia* a partir de suelos de áreas sin alteración o poco alteradas como son: la selva y áreas de explotación agroforestal.
- Aunque en menor porcentaje, existe la posibilidad de obtener aislamientos de *P. chlamydosporia* a partir de suelos provenientes de pastizal y maizal.
- Se logró el primer reporte en México de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*.
- Los aislamientos provenientes de “Los Tuxtlas”, Ver. son capaces de parasitar huevos de *Nacobbus aberrans*.
- Los aislamientos de ambas variedades son igualmente capaces de parasitar huevos de *N. aberrans*.
- El aislamiento SF10A-2* que es de la variedad *catenulata* y el LM37 de *chlamydosporia* mostraron el más alto parasitismo.

I. BIBLIOGRAFIA

- BARRON, G. L. 1977. The nematode destroying fungi. *Topics in Mycobiology*, Canadian Biological Publications Ltd, Canada. no. 1.pp1-140.
- BOURNE, J. M., KERRY B. R. & DE LEJI, F. A. A. M., 1994. Methods for the study of *Verticillium chlamydsoporium* on the Rhizosphere. Supplement to Journal of Nematology 26:587-591.
- CID DEL PRADO V., I. 1983. Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans* (Thorne 1935) Thorne y Allen, 1944. In: Fitopatología Avanzada. (Marban M, N. y Thomason I, J.) Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. pp 58-62.
- CRISTOBAL, A.J., 2000. Estudios epidemiológicos, alteraciones nutrimentales y estadio de sobre-vivencia en el patosistema *Lycopersicon esculntum- Nacobbus aberrans*. Tesis Doctorado, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 68 p.
- DEACON, J. W. 1997. Modern Mycology. Third edition. Blackwell Science, Oxford,UK. 303 pp.
- DOROTEO M., A. 2006, Parasitismo “*in vitro*” de cinco aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydsoporia* (Goddard) Zare Evans y Gams sobre *Nacobbus aberrans* y su estandarización de un método para su producción masiva. Tesis de Licenciatura, Cuautitlan México. pp 7-10.
- FLORES C., R. 2003 Búsqueda de aislamientos de algunos hongos nematofagos para el control de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Torne y Allen, 1944. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. pp 89-99.
- FLORES-CAMACHO, R., MANZANILLA-LOPEZ, R.H., CID DEL PRADO-VERA, I., MARTINEZ-GARZA, A. 2007. Control de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen con *Pochonia chlamydsoporia* (Godard) Gams y Zare. Revista Mexicana de Fitopatología. Enero-

Junio, año/vol.25, numero 001. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Ciudad Obregón, México. pp 26-34.

- FRANCO N., F.; CID DEL PRADO V. I.; ZAVALA-MEJÍA E.; SANCHEZ-GARCIA P. 2002, Aplicación de enmiendas orgánicas para el control de *Nacobbus aberrans* en tomate. *Nematropica*. 32 (2):114-115.
- FRANCO-NAVARRO, F., PEREZ-RODRIGUEZ, I., DOROTEO-MENDOZA, A., VILCHIS-MARTÍNEZ, K., HERNANDEZ-PEREZ, M.A., GONZALEZ-CORNEJO, BRENDA., MIRANDA-DAMIAN, J. 2006.Estado actual del conocimiento de *Pochonia chlamydosporia* en México. Memorias, XXIX Congreso Nacional de Control Biológico, Manzanillo, Colima, pp. 65-69.
- FRANCO-NAVARRO. 2009 Comunicación personal. Datos aún no publicados del proyecto “Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity-Biodiversidad de Nematodos del Suelo en la Reservas de los Tuxtlas, Ver., México”. E mail: ffranco@colpos.mx; ffranco555@hotmail.com.
- FRANS, A.A., DE LEIJ, F. A. A. M. and KERRY B. R., 1991. The nematophagus fungus *Verticillium chlamydosporium* (Goddard), as potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. *Revue Nematologie* 14:157-164.
- HANS-BORJE, J., 1985. The biology of the nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. In *Fitonematologia Avanzada (1)* (N. Marban-Mendoza & I.J. Thomason, eds.). Colegio de Postgraduados, Chapingo, Mexico, pp. 177-194.
- HERNÁNDEZ A., J., 2001. Respuesta de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) a *Nacobbus aberrans*. Tesis de Maestría en Ciencias Especialidad en Fitopatología. Colegio de Posgraduados. Chapingo, Estado de México, Mexico. 76p.

- HERNÁNDEZ, M.A. e HIDALGO-DIAZ L., 2008. Revista de Protección Vegetal Vol.23 No.2 (2008): 131-134. Grupo de Plagas Agrícolas. Dirección de Protección de plantas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. pp 131.
- HIDALGO D., L., BOURNE M.J., KERRY B.R. & RODRIGUEZ M.G., 2000. Nematophagus *Verticillium spp.* in soil infested with *Meloidogyne* in Cuba: insolation and screening. International Journal of Pest Managment. 46:277-284.
- KENING W., RIGGS R.D. and CRIPPEN D., 2005. Isolation, Selection, and Efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for Control of *Rotylenchus reniformis* on Cotton. Phytopatology (Nematology) 95:890-893.
- KERRY, B. R., 1987. 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 Brooms Barn, UK. 90 p.
- KERRY B.R., 1995. Ecological considerations for the use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* , to control plant parasitic nematodes. Canadian Journal of Botany. 73:565-570.
- KERRY, B. R., 2001. Explotaition of the nematofagous fungal *Verticillium chlamydospomrium* 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 and N. Magan (eds.). CABI Publisihing International, UK. pp 155-167.
- 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. and EVANS , K. 2002. The genus

Nacobbus Thorne & Allen 1944 (Nematoda: Prathylenquidae): Systematics, Distribution, Biology and Management. *Nematropica*. 32 (2):149-227.

- MARTÍNEZ-GALLARDO, R. y V. SÁNCHEZ-CORDERO. 1997. Lista de mamíferos terrestres. En E. González Soriano, R. Dirzo y R. C. Vogt Editores. *Historia Natural* de Los Tuxtlas. 1997. Instituto de Biología e Instituto de Ecología. UNAM. pp 36-42.
- PÉREZ-RODRIGUEZ, I., DOROTEO-MENDOZA, A., FRANCO-NAVARRO, F., SANTIAGO-SANTIAGO, V. and MONTERO-PINEDA, A. 2007. Isolates of *Pochonia chlamydosporia* from México as potential biological control agents of *Nacobbus aberrans*. Research note. *Nematropica*, Vol. 37, (1) : 127-134.
- 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.
- PETEIRA, B., ESTÉVEZ, I., ATKINS, S., HIDALGO-DIAZ, L., MONTES DE OCA, N., KERRY, B. 2005. Estabilidad de la cepa IMI SD: 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y W. Gams. Parte II. Indicadores bioquímicos. *Rev. Protección vegetal* Vol. 20 (2) : 102-109.
- RIOS, M. R. C., 2006. Evaluación de los indicadores de degradación del suelo en el Ejido San Fernando, Veracruz, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, pp. 108, 112.
- RODRIGUEZ-KABANA, R., 1991. Control biológico de nematodos parásitos de plantas. *Nematropica* 21: 111-122.
- RZENDOWSKI, J. 1986. Vegetación de México. Ed. Limusa, México, D.F. 432 p.
- SAS 2005, Software Statistical Analysis System version 9.1.3.

- SEGERS R., TARIQ M. B., KERRY B.R., BECKETT A. and PEBERDY J.F., 1994. The role of the proteinase VCP1 produced by the nematophagus *Verticillium chlamydosporium* in the infection process of nematode eggs. *Microbiology* 140: 2715-2723.
- SEMARNAP. 1998. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. Decreto de Reserva de la Biosfera, la región de Los Tuxtlas. *Diario Oficial de la Federación* 23 de Noviembre de 1998. pp. 6-21.
- SEMARNAT-RBLT. 2001. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (RBLT). Borrador. 2001. Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas. 124 pp.
- SHER S.A., 1969. Revision of the Genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Tylenchoidea). Department of nematology, University of California, Riverside, California 92502. pp. 228-235.
- 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 Mexico, Mexico. 150 p.
- VAN DRIESCHE, R.G. and BELLOWS, T.S. 1996. *Biological Control*. Edit. Chapman & Hall, 539 pp.
- WEBSTER J.M. 1972. *Economic nematology, Nematodes and Biological Control*. Academic Press, New York. pp 469-496.
- ZAMUDIO, G.V. 1987. Evaluación de la resistencia de colecciones y variedades de tomate a *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados, Montecillo, Estado de México. 88 p.

- ZARAGOZA, C. 1997. En E. González Soriano, R. Dirzo y R. C. Vogt Editores. Historia Natural de Los Tuxtlas. 1997. Instituto de Biología e Instituto de Ecología. UNAM.
- ZARE, R. and GAMS, W., 2001. A revision of *Verticillium sect. Postrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on Rotiferophthora. Nova Hedwigia. 73: 51-86.

ANEXOS

Tabla 1 Análisis de varianza del experimento 1

Experimento 1	Gl	SC	CM	f calculada	Pr
Tratamiento	34	10439.63871	307.04820	23.08	<0.001
Error	120	1782.70698	14.85591		
Total	154	12222.34839			

Significancia con $\alpha = 0.05$, gl: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrado medio, Pr: probabilidad.

Tabla 2 Análisis de varianza del experimento 2

Experimento 2	Gl	SC	CM	f calculada	Pr
Tratamiento	34	10616.41290	312.24744	67.57	<0.001
Error	120	627.09677	5.22581		
Total	154	11243.50968			

Significancia con $\alpha = 0.05$, gl: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrado medio, Pr: probabilidad.

Tabla 3 Características de los puntos de muestreo

USO DE SUELO	LOC	CLAVE DE AISLAMIENTO	ESPECIE Y VARIEDAD	N	W	ALTURA(m)	% DE HUMEDAD	pH ²	% DE MATERIA ORGÁNICA
Selva	L.M.	LM22	P. c. cat.	18° 25' 73"	94° 57' 10"	255	53.33	5.17	12.48
Selva	L.M.	LM07	Ambas	18° 25' 84"	94° 57' 08"	264	55.47	5.29	8.26
Selva	L. M.	LM09	P. c. chlam.	18° 26' 13"	94° 57' 25"	246	45.94	5.83	ND
Selva	L.M.	LM29	P. c. chlam.	18° 26' 04"	94° 57' 35"	324	45.55	5.47	ND
Selva	S. F.	SF10	Ambas	ND	ND	1000	47.45	5.15	ND
Selva	S. F.	SF07	P. c. chlam.	ND	ND	1035	60.31	4.86	6.69
Selva	S. F.	SF09	P. c. chlam.	ND	ND	980	51.24	5.18	8.71
Selva	S. F.	SF05	P. c. chlam.	ND	ND	1035	45.26	5.86	13.07
Selva	S. F.	SF01	P. c. chlam.	18° 18' 57"	94° 53' 45"	1060	49.93	4.27	7.53
Selva	V. C.	VC25	P. c. cat.	18° 20' 48"	94° 45' 55"	220	45.38	4.58	8.21
Agroforestal	L.M.	LM05	Ambas	18° 25' 60"	94° 57' 99"	316	32.10	4.98	5.45
Agroforestal	L.M.	LM17	Ambas	18° 26' 24"	94° 57' 93"	230	44.45	5.29	10.67
Agroforestal	L.M.	LM16	P. c. chlam.	18° 26' 10"	94° 57' 83"	238	37.59	5.13	ND
Agroforestal	L.M.	LM18	P. c. chlam.	18° 25' 25"	94° 57' 06"	278	49.14	5.01	ND
Agroforestal	L.M.	LM15	P. c. chlam.	18° 26' 13"	94° 57' 78"	248	49.18	5.24	7.67
Agroforestal	S. F.	SF15	P. c. cat.	18° 17' 45"	94° 53' 36"	870	67.08	4.71	9.78
Agroforestal	S. F.	SF16	P. c. chlam.	18° 17' 39"	94° 53' 38"	830	59.70	4.65	ND
Agroforestal	S. F.	SF11	Ambas	18° 16' 83"	94° 53' 30"	800	66.98	5.17	7.86
Agroforestal	S. F.	SF19	P. c. chlam.	ND	ND	1069	58.79	6.16	12.14
Agroforestal	S. F.	(SF10)	P. c. cat.	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pastizal	L. M.	LM25	P. c. chlam.	18° 26' 06"	94° 57' 45"	320	51.60	5.29	7.65
Pastizal	L. M.	LM06	P. c. chlam.	18° 25' 73"	94° 57' 04"	302	47.91	5.26	8.10
Pastizal	L. M.	LM10	P. c. chlam.	18° 26' 23"	94° 57' 55"	209	49.77	5.16	8.02
Pastizal	L. M.	LM11	P. c. chlam.	18° 26' 21"	94° 57' 50"	206	47.38	5.23	ND
Pastizal	L. M.	LM13	P. c. cat.	18° 26' 23"	94° 57' 69"	191	44.17	5.28	6.38
Pastizal	S. F.	SF15	P. c. chlam.	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Maizal	L.M.	LM36	P. c. chlam.	18° 25' 96"	94° 58' 00"	263	36.83	5.58	ND
Maizal	L.M.	LM34	P. c. chlam.	18° 26' 05"	94° 57' 99"	262	34.25	5.17	ND
Maizal	L.M.	LM37	P. c. chlam.	18° 25' 92"	94° 58' 02"	314	46.58	5.40	4.97
Maizal	S.F.	SF5M	P. c. chlam.	ND	ND	990	67.26	5.60	5.88

Datos proporcionados por el Instituto de Ecología. (Ríos, 2006).

L.M.: Localidad López Mateos. V.C.:Venusiano Carranza. S.F.: San Fernando, Loc: Localidad, P.c. chlam.: *Pochonia chlamydosporia* variedad *chlamydosporia*., P.c. cat.: *Pochonia chlamydosporia* variedad *catenulata*, N.D., No hay dato.

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: 50 mg de sulfato de estreptomicina, 50 mg de cloranfenicol y 50 mg de clorotetraciclina.

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.

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 cloranfenicol y 50 mg de clorotetraciclina.