



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

***Pochonia chlamydosporia* COMO AGENTE DE
CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO FALSO
NODULADOR *Nacobbus aberrans* EN EL CULTIVO
DE FRIJOL**

MARIA DE LA LUZ ROMERO TEJEDA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2009

***Pochonia chlamydosporia* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO FALSO
NODULADOR, *Nacobbus aberrans* EN EL CULTIVO DE FRIJOL**

**María de la Luz Romero Tejeda, M.C.
Colegio de Postgraduados 2009**

Con el fin de encontrar alternativas de tipo biológico para el control de *Nacobbus aberrans* en el cultivo de frijol dentro del estado de Zacatecas, se realizó un muestreo en parcelas naturalmente infestadas con el nematodo dentro de tres localidades del Municipio Pozo de Gamboa. De las muestras analizadas, se obtuvo un aislamiento nativo etiquetado como IZ1, utilizando para ello medio Semiselectivo y posteriormente medio Papa-Agar+antibióticos. El hongo se identificó como *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard), Zare y Gams.

A dicho aislamiento, se le realizaron diferentes pruebas para determinar su potencial como agente de control biológico. Las pruebas consistieron en: 1) probar su capacidad de colonización de raíces, tanto de cultivos empleados en esquemas de rotación, como de diferentes variedades de frijol, 2) cuantificar el porcentaje de huevos de *N. aberrans* parasitados por el hongo, y 3) probar su efectividad biológica bajo condiciones de invernadero.

Para la prueba de colonización de raíces se utilizaron, en un primer ensayo, cultivos agrupados con base en su grado de susceptibilidad a *N. aberrans* (hospedantes, pobre hospedantes y no hospedantes); de igual manera, en otro ensayo se probaron diferentes variedades de frijol mejoradas por INIFAP, también con diferente grado de susceptibilidad al nematodo. La prueba de parasitismo de huevos se llevó a cabo bajo condiciones *in vitro*, utilizando la población de *N. aberrans* proveniente de Zacatecas y crecimientos del hongo de 21 días de edad mantenidos en placas de PA+antibióticos. En ambas pruebas se utilizaron dos aislamientos, el nativo obtenido en el presente trabajo y otro aislamiento mexicano probado con anterioridad en trabajos previos (SC1). La efectividad biológica del hongo se probó en condiciones de invernadero, utilizando los dos aislamientos de *Pochonia chlamydosporia* antes mencionados (SC1 e IZ1). Ambos aislamientos fueron incorporados a suelo naturalmente infestado con *N. aberrans* empleando maíz quebrado como sustrato de crecimiento y vermicomposta como vehículo de aplicación. Se establecieron seis tratamientos con cuatro repeticiones cada uno: dos testigos con el nematodo (uno absoluto y otro sólo con vermicomposta), un testigo químico con aplicación de carbofuran, un tratamiento con aplicación del aislamiento SC1 a una dosis de 15,000 clamidosporas g⁻¹ de suelo y dos tratamientos con el aislamiento IZ1 a dosis de 7,500 y 15,000 clamidosporas g⁻¹ de suelo, respectivamente. Sesenta días después de establecido el experimento, se evaluaron diferentes variables de respuesta en la planta, de la población del nematodo y del hongo.

Los aislamientos SC1 e IZ1 colonizaron 100% de los fragmentos de raíz, tanto de los cultivos empleados en esquemas de rotación como de las variedades de frijol probadas. En cuanto al parasitismo de huevos, ambos aislamientos parasitaron huevos del nematodo en condiciones *in vitro*; el aislamiento SC1 parasitó 83.7% de huevos, mientras que el aislamiento IZ1 81.8%.

En condiciones de invernadero, las plantas tratadas con los aislamientos SC1 e IZ1 a alta concentración, presentaron una mayor biomasa en comparación con la del resto de las plantas. El Índice de Agallamiento fue menor en las raíces de las plantas tratadas con el aislamiento IZ1 a la dosis de 7,500 clamidosporas g⁻¹ de suelo. En cuanto los estadios juveniles g⁻¹ de raíces, el menor número de éstos se observó en las plantas con el aislamiento SC1 (6 J₃ y 4 J₄). El menor número de hembras maduras se presentó en plantas con los aislamientos SC1 e IZ1 a baja concentración (5 y 4, respectivamente). Ambos aislamientos se observaron parasitando masas de huevos del nematodo y pudieron ser reaislados a partir de suelo y raíces al final del experimento.

***Pochonia chlamydosporia* AS AGENT OF BIOLOGICAL CONTROL OF THE FALSE ROOT-KNOT
NEMATODE *Nacobbus aberrans* IN THE BEAN CROP**

María de la Luz Romero Tejeda M.C.

Colegio de Postgraduados 2009

In order to find alternatives for the biological control of *Nacobbus aberrans* in bean crop within Zacatecas state, a sampling in plots naturally infested with the nematode into three localities of the Pozo Gamboa township was conducted. One native isolate, labeled as IZ1, was obtained using Semiselective medium and then Potato-Agar+antibiotics medium. The fungus was identified as *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Zare and Gams.

Once isolated different tests to determine its potential as a biological control agent were performed. These tests were: 1) to test their ability to colonize roots as from crops used in rotation schemes as from different bean varieties, 2) to quantify the percentage of *N. aberrans* eggs parasitized by the fungus, and 3) to test their biological effectiveness under greenhouse conditions.

Roots colonization was tested by two trials. In the first one, crops were grouped based on their degree of susceptibility to *N. aberrans* (hosts, poor hosts and non-hosts); in the second one, bean varieties improved by INIFAP were used, which show different degrees of susceptibility to the nematode. Eggs parasitism test was assessed using the population of *N. aberrans* from Zacatecas and 21 days-years-old growths of the fungus on PA+ antibiotics plates. In both tests, two isolates were used, the native one and another isolated and tested in previous studies (SC1). The biological effectiveness of the fungus was tested in greenhouse conditions, using the isolates of *Pochonia chlamydosporia* previously mentioned (SC1 and IZ1). Both isolates were incorporated into soil naturally infested by *N. aberrans*, using cracked corn as growth substrate and vermicompost as application vehicle. Six treatments with four replicates for each one, were established: two controls with nematode (one total and another only with vermicompost), a chemical control with application of carbofuran, one treatment with application of the isolate SC1 at 15,000 chlamydospores g⁻¹ soil and two ones with the isolate IZ1 at 7,500 and 15,000 chlamydospores g⁻¹ soil, respectively. After sixty days, different variables, related to plants, the population of the nematode and the fungus, were evaluated.

Isolates SC1 and IZ1 colonized 100% of root fragments as from crops used in rotation schemes as from different bean varieties. Both isolates parasitized nematode's eggs under *in vitro* conditions; isolate SC1 parasitized 83.7% of eggs and isolate IZ1 81.8%. In greenhouse conditions, plants treated with isolates SC1 and IZ1 at high concentration showed higher biomass compared to the rest of the plants. The Gall Index was lower in the roots of the plants treated with isolate IZ1 at 7,500 chlamydospores g⁻¹ soil. Respect to the number of juveniles g⁻¹ of roots, the lowest number was observed in plants with the isolation SC1 (6 J₃ and 4 J₄). The lowest number of mature females was present in plants with the isolates SC1 and IZ1 at low concentration (5 and 4 respectively). Both isolates were found parasitizing nematode's egg masses and they could be isolated from soil and roots at the end of the experiment.

AGRADECIMIENTOS

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

Al Colegio de Posgraduados, por permitir mi desarrollo académico durante estos años, especialmente a todas las personas que me apoyaron.

Al INIFAP (CEVAMEX), por el préstamo de las variedades de frijol empleadas para los experimentos desarrollados en este trabajo

Al Dr. Ignacio Cid de Prado Vera por sus consejos, comentarios y sugerencias tanto personales como para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Félix Gonzales Cossío por su apoyo en la revisión de este trabajo.

Al M.C. Francisco Franco Navarro por su dedicación, por sus buenos consejos y porque sin su apoyo no hubiera sido posible concluir este trabajo, mil gracias.

A la Dra. Raquel Alatorre y Ariel Guzmán por permitirme el uso del equipo en el laboratorio de Patología de Insectos.

A la M.C. Judith Alfonsina Hernández por su confianza, apoyo y buenos consejos.

Al Dr. Jesús Avelar y a su Familia por su hospitalidad y por el apoyo en los muestreos realizados, en el estado de Zacatecas.

A Alonso Romeo “Pinzón”, por acompañarme a muestrear, por su amistad y por los buenos momentos que pasamos durante el viaje a Zacatecas.

A Jorge Hernández, por su ayuda en el análisis estadístico e interpretación de resultados de este trabajo.

A la M.C. Alejandra Almaraz Sánchez, por su gran amistad, por sus consejos, su asesoría, su paciencia y por apoyarme en cada momento en lo personal y a lo largo de mi formación académica.

A la Dra. Socorro Anaya, por su valioso apoyo, entusiasmo y confianza, que me han ayudado a aprender muchas cosas nuevas.

A mis compañeros y amigos: Magdiel Torres, Rocío Torres, Israel Tlatilpa, Hugo Beltrán, Pedro Santos, Edgar Villar, Fernando Sánchez, Miguel Ángel Lucero, Carlos Acátitla, Hugo Herrera, Alberto Gómez, Flor López, Dulce Ávila, Enrique, por los momentos agradables que compartimos durante estos años.

A Daniela Bocanegra, Gamaliel Alonso, Talina Martínez, Clarisa Sánchez y Roberto Flores, por la gran amistad, apoyo, confianza, pero sobre todo por los grandiosos momentos que pasamos durante los viajes hacia los estresantes Cursos de Inocuidad.

A mis mejores amigos: Rocío, Arlett y Julio, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por sus consejos, su paciencia, su complicidad y por la gran amistad que nos unirá por siempre, mil gracias!!!

A todos, todos mis amigos que no menciono pero que han estado conmigo, a pesar de la distancia y que han sido muy importantes durante todo este tiempo, los quiero!!!!

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Felicitas y Eduardo, por su apoyo incondicional, por alentarme en los momentos más difíciles, por su comprensión y por darle la vida a esta Lucecita que ha cumplido una meta más, gracias a ustedes LOS AMO.

A MIS HERMANOS

Ángel por ser uno de mis grandes motivos de superación y por darme la fuerza, desde el cielo, para seguir adelante y a Eduardo por el gran apoyo durante este tiempo, por las bellas palabras y por los consejos, que a pesar de la distancia me ayudaron para concluir este trabajo, sigue luchando día con día como los buenos revolucionarios (T.Q.M).

A Rosy por ser parte de mi Familia, por su amistad y por las palabras de aliento que fueron clave durante los momentos más estresantes.

A MIS SOBRINAS

Brenda por ser el más bello recuerdo de mi hermano, por su nobleza, cariño, dedicación, por tenerme mucha confianza y a Fátima por ser una pequeña estrellita fugaz, tierna, inocente, dulce y sensible que vino a unirnos aún más como Familia.

A MIS MEJORES AMIGOS

Arlett, Rocío y Julio, porque siempre han estado a mi lado hasta en los momentos en los que todo mundo suele dar la espalda, gracias por su amistad que es incondicional y durara toda la vida.

¡A todos ustedes les dedico este trabajo y les doy mil gracias!

CONTENIDO

RESUMEN GENERAL	iii
GENERAL SUMMARY	vi
INDICE DE CUADROS	x
INDICE DE FIGURAS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos.....	3
1.2. Hipótesis.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. EL CULTIVO DE FRIJOL (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	4
2.1.1. Importancia económica.....	4
2.1.2. Problemática que enfrenta el cultivo del frijol.....	5
2.2. <i>Nacobbus aberrans</i>	6
2.2.1. Diagnósis.....	6
2.2.2. Ciclo de vida.....	6
2.2.3. Sintomatología inducida por <i>N. aberrans</i>	7
2.2.4. Rango de Hospedantes.....	9
2.2.5. Distribución geográfica.....	9
2.2.6. Importancia económica.....	10
2.2.7. Control Biológico de <i>N. aberrans</i>	11
2.3. LOS HONGOS NEMATÓFAGOS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO.....	12
2.3.1. <i>P. chlamydosporia</i>	13
2.3.2. Características biológicas de <i>P. chlamydosporia</i>	14
2.3.3. Eficiencia de <i>P. chlamydosporia</i> como agente de control.....	15

3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. BÚSQUEDA DE AISLAMIENTOS NATIVOS EN CAMPOS INFESTADOS CON <i>N. aberrans</i>	19
3.1.1. Colecta de muestras.....	19
3.1.2. Aislamiento del hongo.....	20
3.2. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE LOS AISLAMIENTOS OBTENIDOS.....	21
3.2.1. Prueba de Colonización de Raíces.....	22
3.2.1.1. Preparación de las semillas.....	23
3.2.1.2. Establecimiento del experimento.....	23
3.2.1.3. Evaluación del porcentaje de colonización de raíces.....	25
3.2.2. Parasitismo de huevos de <i>N. aberrans</i>	25
3.2.3. Prueba de efectividad sobre <i>N. aberrans</i> en condiciones de invernadero.....	26
3.2.4. Análisis Estadístico.....	32
4. RESULTADOS	33
4.1. OBTENCIÓN DE AISLAMIENTOS DE <i>Pochonia chlamydosporia</i>	33
4.2. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE LOS AISLAMIENTOS OBTENIDOS.....	33
4.2.1. Prueba de Colonización de Raíces.....	33
4.2.2. Parasitismo de huevos de <i>N. aberrans</i>	35
4.2.3. Prueba de efectividad sobre <i>N. aberrans</i> en condiciones de invernadero.....	37
5. DISCUSIÓN	48
6. CONCLUSIONES	54
7. RECOMENDACIONES	55
8. LITERATURA CITADA	56

INDICE DE CUADROS

Cuadros	Pág.
1. Número de clamidosporas por aislamiento y concentraciones utilizadas en los tratamientos.....	29
2. Colonización de raíces en cultivos empleados como rotación y con diferente grado de susceptibilidad a <i>N. aberrans</i>	33
3. Colonización de raíces en variedades de frijol con diferente susceptibilidad a <i>N. aberrans</i>	34
4. Análisis de varianza del parasitismo de huevos por parte de dos aislamientos de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> , sobre una población de <i>N. aberrans</i> de la India, estado de Zacatecas.....	34
5. Porcentaje de parasitismo de huevos de <i>N. aberrans</i> por parte de dos aislamientos de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	35
6. a. Análisis de varianza del efecto de la aplicación de dos aislamientos de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> sobre el impacto de <i>N. aberrans</i> en las variables: peso seco del follaje (PSF), Índice de Agallamiento (IA) y peso fresco de raíces (PFR).....	36
6. b. Análisis de varianza del efecto de la aplicación de dos aislamientos de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> sobre las variables: número de J_3 g ⁻¹ de raíz (J_3), número de J_4 g ⁻¹ de raíz (J_4), número de hembras maduras g ⁻¹ de raíz (HM), UFC del hongo en suelo (UFCS) y raíces (UFCR) en plantas de frijol var. Flor de Mayo criollo.....	36

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. <i>P. chlamydosporia</i> A) Conidios portados en conidióforos B) Clamidospora.....	41
2. <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> obtenido de una muestra de suelo de La India 2. A) Conidióforos portando conidios en cabezuela. B) Clamidosporas. C) Crecimiento del hongo en placa de PA.....	41
3. A) Aspecto de una caja Petri con segmentos de raíces de calabaza colonizadas por <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> . B) Observación de la colonización de raíces por parte del hongo, bajo el microscopio de luz (40X).....	42
4. A) Aspecto de una caja Petri con segmentos de raíces de frijol var. Flor de Mayo criollo colonizadas por <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> . B) Observación de la colonización de raíces por parte del hongo, bajo el microscopio de luz (40X).....	42
5. Huevo de <i>N. aberrans</i> parasitado por el aislamiento IZ1 de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> , después de transcurridos los cuatro días de incubación, bajo el microscopio de luz (40X). Alrededor del huevo parasitado es posible observar clamidosporas maduras.....	43
6. Parasitismo de dos aislamientos de <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> probados sobre huevos de una población de <i>N. aberrans</i> . TA= Testigo absoluto, IZ1= aislamiento nativo de Zacatecas, SC1= aislamiento obtenido por Flores (2003).....	44

7. Peso seco del follaje de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo criollo 60 días después de la siembra, con la aplicación o no de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a diferentes concentraciones de clamidosporas.....44
8. Peso fresco de raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo criollo 60 días después de la siembra, con la aplicación o no de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a diferentes concentraciones de clamidosporas.....45
9. Índice de Agallamiento de raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo criollo 60 días después de la siembra, con la aplicación o no de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a diferentes concentraciones de clamidosporas.....45
10. Número de J₃ y J₄ en raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo criollo 60 días después de la siembra, con la aplicación o no de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a diferentes concentraciones de clamidosporas.....46
11. Número de hembras maduras g⁻¹ de raíz en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo criollo 60 días después de la siembra, con la aplicación o no de dos aislamientos de *P.*

chlamydosporia var. *chlamydosporia* a diferentes concentraciones de clamidosporas.....46

12. UFC de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en suelo y raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo criollo 60 días después de la siembra, con la aplicación o no de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a diferentes concentraciones de clamidosporas.....47

1. INTRODUCCIÓN

Nacobbus aberrans, el nematodo falso nodulador, es una de las especies de nematodos fitopatógenos de mayor importancia actualmente en México, debido al daño y a las pérdidas que ocasiona en varias plantas cultivadas como chile (*Capsicum annum* L.), jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.); de hecho, es uno de los patógenos más importantes en las zonas del territorio nacional donde se cultivan hortalizas. Este nematodo se caracteriza por presentar un amplio rango de hospedantes, su alta capacidad reproductiva y de sobrevivencia, así como por lo difícil que resulta su control. Varias han sido las estrategias que se han probado para el control de este nematodo, siendo los nematicidas los que más se utilizan por su rápido efecto y mayor difusión en la agricultura convencional; no obstante, utilizarlos lleva un costo elevado inherente, no sólo en el aspecto económico sino también por los efectos nocivos al medio y a la salud humana. Actualmente la tendencia es no depender solamente del control químico de los patógenos de las plantas, sino buscar estrategias que coadyuven o incluso sustituyan la aplicación de plaguicidas. Los nematodos fitopatógenos no son la excepción, de ahí que muchos de los esfuerzos encaminados al control y manejo de estos organismos se enfoquen hacia estrategias menos dañinas, viables e igual o más eficientes como el control biológico. En el caso de los nematodos fitopatógenos, el control biológico se ha centrado en la utilización de mejoradores orgánicos del suelo, residuos de cosechas como

biofumigantes o la utilización de enemigos naturales (bacterias y hongos, principalmente) capaces de regular sus poblaciones.

Uno de los microorganismos que actualmente se ha utilizado con relativo éxito para el control de nematodos agalladores a nivel mundial es el hongo endoparásito de huevos *Pochonia chlamydosporia*, mismo que ha sido detectado en territorio nacional, principalmente en zonas donde se cultiva jitomate y en algunas áreas naturales del trópico mexicano. También existen trabajos relacionados con el uso de estos aislamientos nativos para el control de poblaciones del nematodo falso nodulador tanto en jitomate como en chile, pero no existe ningún reporte respecto al trabajo con este hongo nematófago en el patosistema *N. aberrans*-frijol.

Dada la importancia que este nematodo tiene en zonas productoras de frijol, principalmente en el estado de Zacatecas y en el cual se han enfocado pocos esfuerzos para su manejo, el presente trabajo tiene como fin probar el potencial como agentes de control biológico de aquel o aquellos aislamiento(s) obtenido(s) en zonas productoras de frijol de Zacatecas. Por esta razón se plantearon los siguientes objetivos e hipótesis.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo General

- Probar aislamientos nativos de *Pochonia chlamydosporia* como agentes de control biológico del nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans*, en el cultivo de frijol.

Objetivos Particulares

- Obtener aislamientos nativos de *Pochonia chlamydosporia* provenientes de algunas localidades del estado de Zacatecas, tanto de suelo como de raíces de frijol.

- Evaluar el efecto de *P. chlamydosporia* *in vitro* e *in vivo* sobre *N. aberrans*.

- Aminorar los daños ocasionados por *N. aberrans* en el cultivo de frijol, mediante la incorporación de aislamientos de *P. chlamydosporia* a suelo naturalmente infestado con el nematodo.

1.2 Hipótesis

La aplicación del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia*, reducirá el inóculo del nematodo y ello se verá reflejado en la reducción de los daños ocasionados por *Nacobbus aberrans* en las raíces de frijol.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El Cultivo de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol es una planta originaria de Mesoamérica y se le conoce con diferentes nombres: judía, alubia o habichuela, entre otros. Se cultiva desde hace ocho mil años y durante ese tiempo se ha desarrollado una gran diversidad de variedades de diferente calidad. En México se han reconocido alrededor de 50 especies, destacándose cuatro domesticadas por el hombre: *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* L. (frijol comba) y *Phaseolus acutifolius* Gray (frijol tepari); en nuestro país las especies más importantes por su superficie sembrada y producción son las dos primeras (Acosta-Gallegos *et al.*, 1996).

2.1.1 Importancia económica

El frijol se considera un alimento básico en la dieta de la población mexicana, sobre todo para las clases más desprotegidas, ya que constituye la fuente principal de proteínas y carbohidratos para dicho sector y en el que muchas de las veces es un alimento insustituible.

En nuestro país, el fríjol, es el segundo cultivo básico de importancia después del maíz con una producción nacional para el año agrícola 1999-2000 de 599.329 toneladas, con un rendimiento promedio de 0.303 ton/ha y un consumo anual *per capita* de aproximadamente 18 kg. Se

cultiva en toda la República Mexicana para autoconsumo (subsistencia), bajo sistemas ancestrales como el "roza-tumba-quema" o bien, sistemas altamente mecanizados (Acosta-Gallegos *et al.*, 1996; Anónimo, 1986).

Los estados productores de frijol más importantes son: Zacatecas, Durango, Chihuahua, Sinaloa, Guanajuato, San Luis Potosí, Nayarit, Puebla y Chiapas (Anónimo, 2000), cultivándose diferentes variedades de frijol basadas en las exigencias de los consumidores; estas variedades se diferencian por su forma, color, tamaño, consistencia del grano, sabor y textura principalmente (Acosta-Gallegos *et al.*, 1996; Anónimo, 1986).

2.1.2 Problemática que enfrenta el cultivo de Frijol

En la actualidad el cultivo de esta leguminosa presenta problemas causados por diferentes factores, tanto abióticos (suelos de baja fertilidad, sequías, lluvias intensas y heladas) como bióticos (hongos, bacterias virus, y nematodos) y socioeconómicos (Hernández, 2001). También enfrenta modificaciones importantes ante una sociedad cambiante, incluidos los hábitos alimenticios –como consecuencia del urbanismo, la migración y las demandas de empleo- y el paso de una economía cerrada a una economía global, las cuales ejercen presión en diversas etapas de la cadena de producción, comercialización, transformación y consumo (Anónimo, 2000).

Como se mencionó anteriormente, factores biológicos como los patógenos de plantas causan problemas para la producción y comercialización de este cultivo; entre los fitopatógenos que presentan un mayor impacto se encuentra el nematodo falso nodulador, *Nacobbus aberrans*, mismo que provoca el deterioro del cultivo y por tanto pérdidas económicas significativas (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

2.2. *Nacobbus aberrans*

2.2.1 Diagnósis

El género *Nacobbus* se caracteriza por el marcado dimorfismo sexual que presentan los estados adultos, ya que el cuerpo de las hembras es sacular, mientras los machos se mantienen vermiformes. Las hembras presentan sólo una gónada dirigida anteriormente, mientras que los machos presentan un testículo, un par de espículas y alas caudales terminales; en ambos casos sus glándulas esofágicas están sobrepuestas dorsalmente al intestino (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

2.2.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *N. aberrans* comienza cuando las hembras adultas secretan una masa gelatinosa sobre la superficie de la raíz para depositar sus huevos en diferentes fases de desarrollo, ya sea en fase embrionaria o bien conteniendo al primer estadio juvenil (J1). Este primer estadio muda dentro del huevo y eclosiona como el segundo estadio (J2), penetrando las

raíces de su hospedante para posteriormente moverse intracelularmente con el fin de alimentarse. Posteriormente el J2 muda dentro de la raíz o en ocasiones en el suelo, dando lugar al tercer estadio juvenil (J3), el cual es menos activo y generalmente se localiza enrollado en la corteza de la raíz. La muda hacia el cuarto estadio (J4) se lleva a cabo en la corteza y permanece ahí hasta que muda a una hembra o un macho (Cid del Prado, 1985). Los machos al ser vermiformes, suelen estar en constante movimiento, ya sea en el suelo o dentro del sistema radical en busca de hembras para fecundarlas. Por su parte las hembras jóvenes o inmaduras, tienen la capacidad de moverse en la corteza de las raíces hacia el haz vascular donde posteriormente inducen y establecen un sitio especializado de alimentación llamado sincicio, mediante el cual se proveen de alimento a partir de la planta. Una vez que la hembra se ha establecido, su cuerpo se ensancha y luego de madurar sexualmente, es fecundada por el macho. Los huevos que produce luego de la fecundación los deposita dentro de una masa gelatinosa y así inicia un nuevo ciclo (Manzanilla-López, *et al* 2002).

2.2.3 Sintomatología inducida por *N. aberrans*

Las plantas hospedantes de este nematodo suelen presentar los siguientes síntomas: achaparramiento, clorosis de hojas, marchitez generalizada, caída de flores y frutos, reducción en el rendimiento, necrosis de la raíz, y agallamiento del sistema de raíces. Las agallas producidas por el nematodo tienden a distribuirse alrededor del eje de la raíz, motivo por el

cual éstas adquieren la forma de cuentas de rosario; ésta es precisamente una característica que distingue la sintomatología inducida por el nematodo falso nodulador de la reportada para *Meloidogyne* (Manzanilla-López, *et al* 2002).

Los cambios celulares e histológicos sugieren que las raíces son afectadas debido a que los nematodos ocasionan una serie de cambios físicos, químicos y fisiológicos. Se considera que la formación de agallas es ocasionada por la hipertrofia, que es estimulada por los juveniles, mientras que el sincicio es inducido por las hembras inmaduras vermiformes y por los juveniles J4 (Manzanilla - López, *et al* 2002).

Los síntomas en frijol son muy similares a los que se mencionaron anteriormente, aunque es necesario realizar una identificación precisa del agallamiento ocasionado por *N. aberrans*, ya que este síntoma pudiera ser confundido con los nódulos nitrificantes producidos por bacterias del género *Rhizobium*. La presencia de ambos tipos de nodulaciones puede ser diferenciada por: 1) el tamaño, ya que las nodulaciones inducidas por las bacterias suelen presentar un menor tamaño 2) su consistencia -los nódulos nitrificantes son más suaves-, y 3) el hecho de que dichos nódulos se desprenden fácilmente de las raíces, ya que se producen sobre la superficie de las mismas.

2.2.4 Rango de Hospedantes

Este nematodo presenta un amplio rango de hospedantes, entre los que se encuentran varias plantas cultivadas como: chile (*Capsicum annum*), jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), tomate (*Physalis ixocarpa* Brot.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), amaranto (*Amaranthus hypocondriachus*), acelga (*Beta vulgaris*), espinaca (*Spinacea oleraceae* L.), chícharo (*Pisum sativum*), pepino (*Cucumis sativus*), calabaza (*Cucurbita pepo* L.), papa (*Solanum tuberosum*), betabel (*Beta vulgaris*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Costilla y González, 1985., Montes, 1986., Zamudio *et al.*, 1990., Canto-Sáenz, 1992., Treviño *et al.*, 1998).

2.2.5 Distribución geográfica

El nematodo falso nodulador se ha reportado en Estados Unidos, Inglaterra, Argentina, Bolivia, Ecuador, Perú, Chile, India, Holanda y Rusia (Cid del Prado *et al.*, 1996; Manzanilla-López *et al.*, 2002). En México se ha encontrado en los estados de Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, México, Morelos, Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí, Tlaxcala y Zacatecas (Cid del Prado, 1986; Cid del Prado *et al.*, 1993; Cruz *et al.*, 1987; García y Trejo, 1995; Toledo *et al.*, 1993; Torres *et al.*, 1994).

2.2.6 Importancia económica

El impacto de *N. aberrans* 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 la más importante por su rentabilidad, demanda de mano de obra, rendimiento y relevancia como producto de exportación (Hernández, 2001). En 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 50 y 70% (Cristóbal *et al.*, 2001).

Cristóbal Alejo (2001), trabajando con tres condiciones de manejo en un predio naturalmente infestado con *N. aberrans*, estimó las pérdidas de producción de jitomate en 12% bajo un esquema de Control Integrado, 29% empleando prácticas agronómicas regionales y 83% cuando no se realizó ningún control.

En lo que respecta al frijol, Silva (1989) estimó que este nematodo puede reducir el rendimiento entre 18% y 32% en la variedad Negro Puebla y de 18 a 36% en la variedad Canario.

2.2.7. Control biológico de *N. aberrans*

Entre los métodos que existen para el control de los nematodos fitopatógenos, el control químico es la opción que más se ha utilizado pero que a su vez representa altos costos, tanto económicos como ambientales (Manzanilla-López *et al.* 2002). Los nematicidas no fumigantes que han dado buenos resultados carecen de efectividad duradera y su uso sólo se justifica en cultivos económicamente redituables y alta o medianamente tecnificados (Cid del Prado *et al.*, 1995). Por tal motivo, es importante considerar que la aplicación de nematicidas no es la única solución y existen otras de efectividad similar, e inclusive mayor, bajo ciertas condiciones de producción.

Actualmente, las estrategias de tipo biológico han recibido un gran impulso ante los problemas de contaminación que caracterizan a los sistemas de producción agrícola hoy en día. Cuando se habla de control biológico se piensa primeramente en el uso de organismos antagonistas (competidores, depredadores o parásitos) del patógeno de interés y aunque existen algunas otras estrategias de naturaleza biológica (mejoradores orgánicos del suelo y residuos de cosechas como biofumigantes), el uso de estos agentes es el más representativo. 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 (Mendoza de Gives *et al.*, 1994).

2.3. Los hongos nematófagos como agentes de control biológico

Dentro de los hongos utilizados como biocontroladores de nematodos, se encuentran *Dactylaria*, *Arthrobotrys* y *Monacrosporium*, los cuales tienen la capacidad de producir trampas adhesivas o presentar anillos adhesivos o constrictores. En general, este grupo de hongos se puede producir *in vitro* fácilmente y se encuentran en un gran número de hospedantes, aunque en el suelo sobreviven por poco tiempo (Brown y Kerry, 1987).

Otro grupo de hongos nematófagos de importancia, que ha sido empleado para el control de nematodos inductores de agallas en raíces, es el de endoparásitos de huevos como *Paecilomyces*, *Meria*, *Cephalosporium* y *Pochonia*; estos hongos se caracterizan porque pueden ser producidos fácilmente *in vitro*, presentan un amplio rango de hospedantes y algunos de ellos son capaces de colonizar la rizosfera de las plantas, además de sobrevivir en el suelo aun en ausencia de = hospedante (Doroteo, 2006). En la actualidad, *P. chlamydosporia* es el hongo que ha sido empleado con mayor frecuencia, debido a los resultados que se han obtenido al ser empleado como agente de control biológico contra nematodos agalladores de la raíz (Flores, 2003; Pérez-Rodríguez, 2004 y 2008; Doroteo, 2006).

2.3.1. *Pochonia chlamydosporia*

P. chlamydosporia se consideró hasta el año 2001, una especie del género *Verticillium*, el cual incluía organismos que se alimentan de rotíferos, de otros hongos y otros con hábitos saprófagos, fitófagos, entomófagos y nematófagos. Uno de los primeros trabajos encaminados a la redefinición de varias de las especies incluidas en el género *Verticillium* fue el de Zare *et al.* (2000), en el que reestructuraron dicho género mediante la reagrupación de los hongos ubicados en la sección *Prostrata*, (la cual concentraba hongos saprófitos y parásitos de invertebrados como insectos, artrópodos, nematodos, así como de otros hongos). Derivado de esta reestructuración se obtuvieron cuatro categorías: A) que incluye especies de hábitos saprófitos y fitófagos que forman conidióforos erectos; B) la cual comprende especies que forman colonias de colores claros y de apariencia algodonosa, con hábitos micófagos y entomófagos y sin presencia de clamidosporas; C) la cual incluye especies saprófitas, caracterizadas por presentar conidios adhesivos y con capacidad de actuar como endoparásitos de nematodos, y D) en donde se agrupan especies saprófitas y colonizadoras de huevos y quistes de nematodos.

En un trabajo posterior Gams y Zare (2001), concluyeron que la reestructuración del género daba como resultado cuatro géneros: 1) *Lecanicillium*, donde se incluyen especies entomófagas y micófagas; 2) *Haptocillium*, que incluye especies nematófagas productoras de conidios adhesivos y sin clamidosporas; 3) *Rotiferophthora*, en la que se encuentran

especies parásitas de rotíferos, y 4) *Pochonia*, en la que se agrupan parásitos de huevos y quistes de nematodos que son capaces de formar clamidosporas.

2.3.2. Características biológicas de *P. chlamydosporia*

P. chlamydosporia se caracteriza por presentar colonias de rápido crecimiento (20-38 mm de diámetro a los 10 días), de apariencia algodonosa y color blanco que con el tiempo se tornan de color crema. Su temperatura óptima de crecimiento va de los 24 a los 27°C. Los conidióforos son usualmente postrados y con hifas aéreas, algunas veces erectas; fiálides verticiladas o solitarias. Los conidios presentan forma subglobosa, elipsoidal a bacilar, agrupándose en cabezuelas. Producen estructuras de resistencia que son las clamidosporas sobre la superficie de la colonia (Fig.1) (Domsh y Gams, 1980 y Zare *et al.*, 2001). *P. chlamydosporia* parasita huevos de nematodos formadores de agallas mediante la formación de apresorios que se desarrollan a partir de la hifa indiferenciada y que les permite la colonización de la superficie de los huevos de los nematodos (Morgan *et al.*, 1985); posteriormente, la penetración de los huevos se da debido a la presión física y a la actividad enzimática por parte del hongo mediante la proteasa serina alcalina - subtilasa-, denominada VCP1; esta enzima ha sido parcialmente caracterizada y en pruebas *in vitro* ha demostrado que es capaz de

remover la membrana vitelina más externa del córion del huevo y exponer la capa de quitina (López-Llorca y Robertson, 1992).

2.3.3. Eficiencia de *P. chlamydosporia* como agente de control

Existen estudios sobre *P. chlamydosporia* que han tratado de conocer de una mejor manera su eficiencia como agente de control biológico. Al respecto, De Leij y Kerry (1991) probaron tres aislamientos de este hongo para el control de *Meloidogyne arenaria* en plantas de tomate, encontrando que sólo un aislamiento redujo 80% la población del nematodo. Crump e Irving (1992) por su parte, detectaron que este hongo es capaz de reducir la eclosión de huevos en *Heterodera schachtii* y *Globodera pallida* en 75 y 76%, respectivamente.

De Leij *et al.* (1993a), identificaron que en raíces de tomate cv. Pixie, inoculando 10,000 clamidosporas de *P. chlamydosporia* g⁻¹ de suelo, el número de huevos larvados a punto de eclosionar y de juveniles de *Meloidogyne incognita*, se redujo 70 y 50% respectivamente. En otro trabajo, De Leij *et al.* (1993b), inocularon 14,000 clamidosporas g⁻¹ de suelo del hongo en algunos puntos cercanos a la base del tallo y encontraron que después de nueve semanas, en estos puntos, el parasitismo de masas de huevos de *M. incognita*, era más elevado que en los puntos donde el hongo no había sido inoculado.

Mousa *et al.* (1995) evaluaron aislamientos de *P. chlamydosporia* como agente de control biológico de *Meloidogyne javanica* en plantas de tomate resistentes y susceptibles (cvs. Prichard y Castlerock); en el caso de la variedad susceptible, se detectó una reducción en el número de agallas y de hembras maduras (50 y 80% respectivamente), en comparación con el testigo. En las plantas resistentes ambos parámetros presentaron una disminución no significativa con respecto al testigo; a través de otras pruebas se determinó que el mejor momento para inocular al hongo en el suelo es dos semanas antes del transplante.

Para Kerry (1997), es muy importante evaluar el potencial parasítico de diferentes aislamientos de *P. chlamydosporia* y para ello recomienda llevar a cabo dos tipos de pruebas: 1) pruebas *in vitro*, entre las que sobresale el porcentaje de parasitismo de huevos y la prueba de colonización de raíces de plantas (preferentemente de plantas susceptibles al nematodo) y 2) pruebas bajo condiciones de campo.

Mediante estas pruebas es posible determinar cuáles aislamientos pueden utilizarse como agentes de control biológico; por ejemplo, un porcentaje de parasitismo de huevos igual o mayor al 80% sería un muy buen indicador del potencial de un aislamiento dado, para posteriormente ser evaluado en invernadero y en campo. Para este investigador, las pruebas en invernadero tienen como finalidad conocer y estandarizar la cantidad mínima de inóculo del hongo que será utilizada en trabajos a nivel de campo.

Por su parte Hidalgo *et al.* (2000), realizaron un estudio en el que colectaron alrededor de 83 aislamientos de dos especies de *Pochonia*, siendo 23 los que eligieron como representativos de la zona; 10 pertenecientes a *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* y 13 a *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. De los 23 aislamientos se llevaron a cabo pruebas de parasitismo en huevos de *Meloidogyne incognita*, porcentaje de colonización de raíces y producción de clamidosporas en forma masiva sobre arroz como sustrato de crecimiento. Se encontró que el parasitismo de huevos fue de 53 a 88%, siendo los aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* los de mejores resultados en la colonización de raíces, los porcentajes oscilaron entre 46 y 100%, mostrando los mejores resultados los aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

Flores (2003), realizó algunos estudios en distintos estados de la Republica Mexicana y obtuvo cinco aislamientos pertenecientes a *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, a partir de muestras de suelo y de raíces provenientes de predios naturalmente infestados con *N. aberrans*. A partir de estos aislamientos llevó a cabo pruebas de parasitismo *in vitro*, y encontró que su capacidad de parasitar los huevos de tres poblaciones diferentes de *N. aberrans* osciló entre 59 y 89%. Al realizar otra prueba con estos mismos aislamientos con el fin de evaluar su capacidad de colonización de raíces, obtuvo porcentajes de colonización entre el 46 y el 93%.

Pérez-Rodríguez (2004) realizó un estudio en el que probó los mismos cinco aislamientos reportados por Flores (2003) bajo condiciones de invernadero y utilizando suelo naturalmente infestado con *N. aberrans*. Encontró que las plantas tratadas con el aislamiento SC1 a una dosis de 15,000 clamidosporas g⁻¹ de suelo, mostraron una menor población de nematodos, así como menores daños en las plantas de jitomate en comparación con las del tratamiento testigo y del resto de los tratamientos.

Posteriormente Pérez-Rodríguez (2008), al trabajar con chile susceptible a *N. aberrans*, probó tres estrategias de control (químico, biológico y cultural), bajo condiciones de campo e invernadero; en la primera fase detectó que la incorporación de vermicomposta y residuos de col al suelo redujeron las poblaciones de juveniles (J₃ y J₄) y de hembras maduras, además de incrementar el desarrollo de la parte aérea de las plantas y reducir el índice de agallamiento. En la fase de campo encontró que la incorporación de vermicomposta y residuos de col en combinación con la aplicación de *P. c. var. chlamydopsoria* dieron lugar a plantas con peso seco del follaje mayor y un índice de agallamiento menor, comparado con el tratamiento testigo, ello a los 100 días posteriores al transplante; también el número de juveniles y de hembras maduras fue menor. El hongo pudo reaislarse del suelo de los tratamientos donde fue aplicado y fue detectado parasitando masas de huevos del nematodo falso nodulador.

Los tratamientos a los que se les asoció un mayor rendimiento fueron: Vermicomposta (732.76 kg/ha⁻¹), Vermicomposta+Col (777.16kg/ha⁻¹) y Vermicomposta+*P. chlamydosporia* (792.95 kg/ha⁻¹).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los sitios de muestreo en Zacatecas se seleccionaron con base en los antecedentes de la presencia e impacto de *N. aberrans* en la zona y en la observación de síntomas tanto aéreos como subterráneos característicos de la enfermedad (manchones con plantas achaparradas, cloróticas y con el típico agallamiento de raíces).

3.1 Búsqueda de aislamientos nativos en campos infestados con *N. aberrans*.

3.1.1 Colecta de muestras

La colecta de muestras se llevó a cabo en tres predios (Pozo de Gamboa, India I e India 2), ubicados todos ellos en las principales zonas productoras de frijol del estado de Zacatecas, y además caracterizados por la presencia (agallas) e impacto del nematodo falso nodulador (manchones en la plntación de frijol).

Una vez seleccionados los sitios de muestreo, las muestras tanto de suelo como de raíces se tomaron siguiendo un patrón aleatorio. El suelo se

colectó en la periferia de las raíces, eliminando los primeros 5cm de la superficie y tomando muestras de 200g de suelo entre los 15 y 25cm de profundidad; en cuanto a las raíces, se tomaron 50g en cada punto donde se colectó suelo. Cada muestra tanto de suelo como de raíces se colocó por separado en bolsas de plástico etiquetadas y se mantuvieron en una hielera para conservarlas frescas hasta su traslado al laboratorio para su procesamiento.

3.1.2 Aislamiento del hongo

Con el fin de obtener uno o más aislamientos nativos de las zonas productoras de frijol de Zacatecas, las muestras de suelo y raíces se procesaron por separado de acuerdo con el protocolo descrito por Pérez-Rodríguez (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 American Optical© a una magnificación 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. 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 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. 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 nematófagos del Colegio de Postgraduados.

3.2 Evaluación del potencial de los aislamientos obtenidos

Para evaluar el potencial como agente de control biológico de los aislamientos obtenidos de *Pochonia chlamydosporia* se realizaron dos pruebas que suelen ser fundamentales para tal fin (Pérez-Rodríguez 2004): 1) la capacidad para colonizar raíces y 2) el porcentaje de parasitismo de huevos del nematodo en condiciones *in vitro*.

Una vez realizadas ambas pruebas, los aislamientos obtenidos se incrementaron masivamente con el fin de probar su potencial como agente de control biológico sobre *N. aberrans* en condiciones de invernadero.

3.2.1 Prueba de Colonización de Raíces

Se llevó a cabo en el laboratorio de Nematología Agrícola del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo en Texcoco, Estado de México. El objetivo de dicha prueba fue identificar el rango de cultivos cuyas raíces pueden ser colonizadas por el aislamiento de *P. chlamydosporia* obtenido a partir de los muestreos previos en los predios de Zacatecas. Este conocimiento permitirá saber con cuáles de estos cultivos –empleados como parte de los ciclos de rotación en el Estado de Zacatecas-, se puede garantizar la presencia del hongo en la rizosfera de los mismos, bajo un esquema de biomanejo del nematodo y en el que se incorpore la rotación de cultivos como un componente de éste.

Los cultivos probados se agruparon con base en su grado de susceptibilidad a *N. aberrans* en hospedantes, pobre hospedantes o no hospedantes. Estos cultivos fueron: maíz, col y brócoli (todos no hospedantes), calabaza, avena y tomate de cáscara (pobres hospedantes) y jitomate y chile (hospedantes) (Cid del Prado *et al.*, 1997). De manera adicional se estableció otro ensayo en el que sólo se probaron variedades de frijol mejoradas por INIFAP con diferente grado de susceptibilidad al nematodo; estas variedades fueron: Bayo INIFAP y Flor de Mayo Criollo (variedades susceptibles), Flor de Mayo M-38 (variedad tolerante) y Bayo Mecertral (variedad resistente).

3.2.1.1 Preparación de semillas

En condiciones estériles se embebieron por separado seis semillas de cada cultivo en un recipiente con agua destilada durante 10 minutos para su imbibición. A continuación, las semillas se sumergieron durante un minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 8.0%, donde permanecieron en agitación constante; una vez transcurrido el minuto, las semillas se enjuagaron con agua esterilizada de cuatro a cinco veces para eliminar el exceso de hipoclorito. Las semillas se distribuyeron sobre papel absorbente dentro de una caja de Petri, ambos esterilizados. El papel absorbente se humedeció con agua destilada esterilizada y las semillas se incubaron a 27°C durante ocho días para el caso de semillas grandes (maíz y calabaza) y aproximadamente doce días para semillas pequeñas (resto de los cultivos); con la incubación a esta temperatura se garantizó una mayor y mejor germinación de las semillas de cada cultivo estudiado.

3.2.1.2 Establecimiento del experimento

A la par de la germinación de las semillas, se llenaron tubos de ensayo (de 3cm de diámetro) con aproximadamente 70g de vermiculita humedecida con agua destilada, los cuales se esterilizaron durante 30 min a 120°C. Luego de esterilizada la vermiculita, los tubos se dejaron enfriar por espacio de 24 hrs. para después sembrar en cada uno de ellos, por debajo de la superficie de la vermiculita, tres círculos de medio PA+antibióticos de 1cm de diámetro, mismos que contenían el aislamiento de *P. chlamydosporia* de aproximadamente 20 días de edad; cabe mencionar

que a la par de la inoculación del aislamiento obtenido de Zacatecas, se inocularon de la misma manera tubos con un aislamiento denominado previamente como SC1 por Flores (2003), y que corresponde a *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Una vez inoculados ambos aislamientos en los tubos respectivos, en diferentes lotes de éstos se fueron transplantando las semillas germinadas de los distintos cultivos probados, todo bajo condiciones estériles. En cada tubo se colocaron dos plántulas, para el caso de semillas grandes (maíz y calabaza) y tres para semillas pequeñas (resto de los cultivos); a cada cultivo se le destinaron tres tubos de ensaye con vermiculita. Todos los tubos con sus respectivas plántulas, se colocaron completamente al azar en una incubadora a 27°C bajo oscuridad durante una semana, esto en el caso del maíz y la calabaza -debido a su rápido y profuso crecimiento de raíces- y hasta dos semanas para el resto de cultivos, ello a consecuencia de la poca cantidad de raíces delgadas que la mayoría de ellos produjeron en las condiciones del experimento.

3.2.1.3 Evaluación del porcentaje de colonización de raíces

Luego del período de incubación de las plantas por una y dos semanas, en condiciones estériles se sacaron las plantas de cada tubo y se les removió el exceso de sustrato adherido a las raíces; para la remoción de sustrato, a cada raíz se le dio un ligero enjuague con agua destilada esterilizada y posteriormente se colocaron en una sanita también esterilizada para eliminar el exceso de agua. Posteriormente las raíces se cortaron en trozos

de 1cm aproximadamente y se sembraron en cajas de Petri con PA + antibióticos para luego incubarlas durante siete días a 27°C. Por cada tubo o repetición, se sembraron tres cajas de Petri con 2-6 fragmentos de raíces. Transcurridos los siete días de incubación, las cajas se revisaron directamente para cuantificar el número de fragmentos colonizados por el hongo y determinar así el porcentaje de colonización. Para corroborar que la colonización había sido por parte del hongo, los fragmentos se observaron bajo un microscopio compuesto American Optical© a un aumento de 40X.

3.2.2 Parasitismo de huevos de *N. aberrans*

Para llevar a cabo esta prueba, se emplearon dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* obtenidos de predios naturalmente infestados con *N. aberrans*: el SC1 etiquetado por Flores (2003) y el IZ1, etiquetado durante la realización de este trabajo. Ambos 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 La “India 2”, Zacatecas. La preparación del inóculo de *P. chlamydosporia*, la extracción de huevos de *N. aberrans* y el establecimiento y evaluación del experimento se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Doroteo (2006).

3.2.3 Prueba de efectividad sobre *Nacobbus aberrans* en condiciones de invernadero.

Esta prueba se montó en el invernadero del Área de Nematología Agrícola del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. El suelo utilizado bajo estas condiciones fue naturalmente infestado con *N. aberrans* proveniente de las localidades previamente muestreadas en Zacatecas en búsqueda de aislamientos nativos del hongo. En total de los tres predios muestreados, se tomaron y trajeron aproximadamente 100 kg de suelo, colectándose éstos entre los 10 y los 30cm de profundidad.

El suelo naturalmente infestado se homogeneizó y luego se repartió en macetas de 3 kg de capacidad, a las cuales se les sembraron semillas de frijol susceptible al nematodo (Flor de Mayo criollo), con el fin de incrementar el nivel de inóculo del nematodo hasta que se les fueran a aplicar los diferentes tratamientos. Las macetas con frijol susceptible se mantuvieron hasta los 30 días posteriores a la siembra, momento en el cual ya se observaba agallamiento en las raíces de las plantas de frijol. Las raíces agalladas se separaron del follaje y se incorporaron al suelo para incrementar el inóculo; una vez incorporadas las raíces el suelo se removió y se procedió a aplicar los tratamientos.

El experimento en invernadero se realizó bajo un diseño completamente al azar y constó de 6 tratamientos, cada uno con cuatro repeticiones, dando un total de 24 unidades experimentales. En cada una de ellas se

sembraron cuatro semillas de frijol Flor de Mayo criollo, como hospedante susceptible al nematodo. Los tratamientos que se aplicaron fueron los siguientes:

T₁: Testigo absoluto (sólo *N. aberrans*) [**TA**].

T₂: Testigo con *N. aberrans* + vermicomposta y sin hongo [**TA+V**].

T₃: Testigo químico (Furadan® i.a. carbofuran a dosis de 4 L ha⁻¹) y sólo *N. aberrans* [**TQ**].

T₄: *N. aberrans* + *P. chlamydosporia* aislamiento SC1 (15,000 clamidosporas g⁻¹ de suelo) y vermicomposta [**SC1**].

T₅: *N. aberrans* + *P. chlamydosporia* aislamiento IZ1 (7,500 clamidosporas g⁻¹ de suelo) y vermicomposta [**IZ1-DB**].

T₆: *N. aberrans* + *P. chlamydosporia* aislamiento IZ1 (15,000 clamidosporas g⁻¹ de suelo) y vermicomposta [**IZ1-DA**].

Del nematicida se realizaron dos aplicaciones con base en muestreos destructivos de plantas de frijol mantenidas a la par de las del experimento y en las que cada tercer día, luego de la aparición de las primeras hojas verdaderas, se monitoreó la presencia o no de nematodos. Una vez establecida la fecha de la primera aplicación, se hizo una segunda aplicación 15 días después. Se vigiló que el suelo se mantuviera húmedo durante el transcurso del experimento y las plantas se fertilizaron cada 20 días con Bayfolan forte® (4L ha⁻¹) durante el período vegetativo.

Respecto al hongo, se utilizaron dos aislamientos de *P. chlamydosporia*, uno denominado SC1 y que ya ha sido probado previamente en diferentes estudios (Flores, 2003; Doroteo, 2006; Pérez-Rodríguez, 2004 y 2008), y otro denominado IZ1, mismo que fue el obtenido previamente en el muestreo realizado en campos naturalmente infestados con *N. aberrans* en el estado de Zacatecas.

Los aislamientos del hongo utilizados se produjeron e incrementaron masivamente utilizando maíz quebrado como sustrato de crecimiento (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007), para luego inocularse en los tratamientos correspondientes. Antes de su aplicación, a ambos aislamientos se le realizaron pruebas de calidad (número de clamidosporas y UFC g⁻¹ de sustrato colonizado, así como porcentaje de germinación de clamidosporas), esto a los siete días después del secado y refrigerado; para tal fin, se siguió la metodología descrita por Doroteo (2006).

Derivado de las pruebas de calidad del sustrato y luego de hacer el conteo respectivo de clamidosporas g⁻¹ de maíz colonizado por cada aislamiento y con ayuda de un hematocitómetro, se estimó la cantidad de sustrato colonizado a utilizar en los diferentes tratamientos (Cuadro 1), tomando en cuenta las concentraciones previamente establecidas.

Cuadro 1. Número de clamidosporas por aislamiento y concentraciones utilizadas en los tratamientos.

Aislamiento	No. de clamidosporas g⁻¹ de maíz quebrado	ue	Gramos de producto ue⁻¹
IZ1	5.4 x 10 ⁻⁶	3 kg de suelo	21.6 g
			(7,500 cls g ⁻¹ de suelo)
			10.8 g
			(15,000 cls g ⁻¹ de suelo)
SC1	5.0 x 10 ⁻⁶		10.0 g
			(15,000 cls g ⁻¹ de suelo)

ue= unidad experimental (maceta); cls = clamidosporas

Respecto a la germinación de clamidosporas y al número de UFC g⁻¹ de sustrato colonizado, en el caso del aislamiento IZ1 se presentó un porcentaje de germinación del 76% y un total de 6.05 x 10⁶ UFC g⁻¹ de sustrato colonizado; por su parte, del aislamiento SC1 la germinación de clamidosporas fue del 80% y el número de UFC g⁻¹ de maíz quebrado colonizado fue de 6.76 x 10⁶.

Para que ambos aislamientos se pudieran incorporar al suelo fue necesario utilizar como vehículo un material orgánico como la vermicomposta, elaborada ésta a base de estiércol de cabra y aplicada en dosis de 15 ton ha⁻¹; la aplicación se realizó ocho días después de la siembra. A excepción de los tratamientos donde la vermicomposta se

aplicó junto con el hongo, en uno de ellos se aplicó sola con el fin de establecer el efecto único del abono en las plantas de frijol sin la presencia del hongo.

El experimento se levantó 60 días posteriores a la siembra del frijol para evaluar variables de respuesta en la planta, en la población del nematodo y en el hongo. Las variables evaluadas fueron:

1) en la planta:

Peso seco del follaje: para tal fin, se cortó la parte aérea de cada planta y se colocó en bolsas de papel debidamente etiquetadas dentro de una estufa a 40°C durante 72 horas.

Peso fresco de raíces: en este caso, primeramente las raíces se lavaron para eliminar el exceso de suelo, posteriormente se escurrieron para eliminar el exceso de agua y finalmente se pesaron.

Índice de Agallamiento: éste se evaluó con el fin de determinar el impacto del nematodo en las plantas de frijol; para ello, se estimó el cociente que resulta de dividir el número de agallas entre el peso fresco de las raíces.

2) en la población del nematodo:

Número de estadios juveniles (J_3 y J_4) g^{-1} de raíz: por cada tratamiento, se mezclaron todas las raíces de una misma repetición y se fragmentaron; posteriormente, de dicha muestra compuesta se tomó una submuestra de

1g y se licuó durante un minuto a intervalos de 10 seg (4). Una vez licuado el gramo de raíces éste se tamizó en tamices de 60, 100 y 400 mallas y el material retenido en los dos últimos se colocó en un vaso de precipitado para su posterior revisión. El conteo de nematodos se hizo como lo indica Pérez-Rodríguez (2008).

Número de hembras maduras g^{-1} de raíz: en este caso, las hembras se cuantificaron mediante la disección de raíces teñidas con fucsina ácida (Byrd *et al.*, 1983); para ello, se procesó un gramo de raíces tomado de la muestra compuesta obtenida por repetición.

3) en el hongo:

Parasitismo de masas de huevos: para evaluar esta variable se extrajeron 20 masas de huevos a partir de la muestra compuesta de raíces correspondiente a cada repetición. El procedimiento que se siguió fue el descrito por Pérez-Rodríguez (2008).

*Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *P. chlamydosporia* en suelo y raíces:* ambas variables del hongo se evaluaron siguiendo los protocolos descritos por Pérez-Rodríguez (2004).

3.2.4 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de las variables de respuesta de las pruebas realizadas fueron sometidos a un análisis de varianza y a la prueba de comparación de medias ortogonales de Tukey ($\alpha=0.05$), mediante el programa de computo Statistical Analysis System (SAS©).

4. RESULTADOS

4.1 Obtención de aislamientos de *Pochonia chlamydosporia*

De las muestras de suelo y raíces colectadas en Zacatecas, así como de las masas de huevos de *N. aberrans*, sólo se obtuvo un aislamiento de suelo proveniente de La India 2, que fue etiquetado como IZ1, por ser el primer aislamiento obtenido en el Estado. El predio se ubica a los 23°00'9" lat N y 102°30'7" long O. El aislamiento obtenido fue identificado como *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a partir de la observación de preparaciones fijas elaboradas con crecimientos provenientes de placas de PA+antibióticos de veinte días de edad. En las preparaciones se observaron las características que distinguen a esta variedad, entre las que sobresalen sus conidióforos con conidios de forma subglobosa adheridos y agrupados en cabezuelas; además, a los siete días de crecimiento se presentaron las clamidosporas o estructuras de resistencia. En placas de PA el crecimiento presenta una apariencia algodonosa, con colonias de bordes redondeados de color blanco que con el tiempo se tornan de color crema (Fig 2).

4.2 Evaluación del potencial de los aislamientos obtenidos

4.2.1 Prueba de Colonización de Raíces

Los porcentajes de colonización de las raíces del primer grupo de plantas se presentan en el Cuadro 2. Se observó que ambos aislamientos

colonizaron 100% de las raíces de todos los cultivos probados (Fig. 3). Cabe mencionar que al revisar todas las cajas de Petri de ambos aislamientos, luego de siete días posteriores a la siembra de los segmentos, se observó que sólo en donde estaban las raíces de calabaza se presentaron clamidosporas, mientras que éstas se comenzaron a observar en las raíces de los cultivos restantes a partir del noveno y décimo día.

Cuadro 2. Colonización de raíces en cultivos empleados como rotación y con diferente grado de susceptibilidad a *N. aberrans*.

Cultivo	Aislamientos	
	IZ1	SC1
Hospedantes		
- jitomate	100%	100%
- chile	100%	100%
Pobre hospedantes		
- calabaza	100%	100%
- tomate de cáscara	100%	100%
- avena	100%	100%
No hospedantes		
- maíz	100%	100%
- col	100%	100%
- brócoli	100%	100%

En el Cuadro 3 se presentan los porcentajes de colonización de las raíces de las variedades de frijol. Tanto el aislamiento IZ1 como el SC1 colonizaron 100% de las raíces (Fig. 4). En este lote de plantas de frijol se observó que la aparición de clamidosporas en ambos aislamientos se presentó al doceavo día de incubación de las placas de PA.

Cuadro 3. Colonización de raíces en variedades de frijol con diferente susceptibilidad a *N. aberrans*.

Variedad de frijol	Aislamientos	
	IZ1	SC1
Susceptibles		
- Flor de Mayo criollo	100%	100%
- Bayo INIFAP	100%	100%
Tolerante		
- Flor de Mayo M-38	100%	100%
Resistente		
-Bayo Mecentral	100%	100%

4.2.2 Parasitismo de huevos de *N. aberrans*

Los dos aislamientos que fueron probados (SC1 e IZ1) se encontraron parasitando huevecillos de *N. aberrans* (Fig. 5). De acuerdo con el análisis de varianza, hubo diferencias altamente significativas (Tukey $\alpha= 0.01$) en el porcentaje de parasitismo entre ambos aislamientos en la población del nematodo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza del parasitismo de huevos por parte de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, sobre una población de *N. aberrans* de la India, estado de Zacatecas.

F.V.	G.L.	SC1 - IZ1*
Modelo	1	0.0001**
Error	8	-
Total	9	-
R ²	-	0.971
C.V.	-	0.213

**Altamente significativo C.V. = Coeficiente de Variación F.V. = Fuente de Variación G.L. = Grados de Libertad, * Ambos aislamientos presentaron los mismos resultados.

De acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey (Cuadro 5), se observó que el aislamiento que presentó el mayor porcentaje de parasitismo fue el aislamiento SC1 (83.7%), mientras que el aislamiento IZ1 presentó un porcentaje de parasitismo de 81.8% (Fig.6).

Cuadro 5. Porcentaje de parasitismo de huevos de *N. aberrans* por parte de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

Tratamiento	PPH ($\alpha= 0.01$; $r^2= 0.97$)
Testigo (sin hongo)	0.0 c
SC1	83.7a
IZ1	81.8 b
D.M.S.	0.25

Las medias con la misma letra no difieren significativamente ($\alpha= 0.01$). PPH = Porcentaje de Parasitismo de Huevos. D.M.S. = Diferencia Mínima Significativa.

4.2.3 Prueba de efectividad sobre *Nacobbus aberrans* en condiciones de invernadero

El análisis de varianza aplicado para las variables de respuesta en esta fase de trabajo, indicó que sólo en algunos casos se presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 6a y 6b).

Cuadro 6a. Análisis de varianza del efecto de la aplicación de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* sobre el impacto de *N. aberrans* en las variables: peso seco del follaje (PSF), Índice de Agallamiento (IA) y peso fresco de raíces (PFR).

F.V.	G.L.	PSF	IA	PFR
Modelo	5	0.2727	0.0009**	0.3513
Error	18	-	-	-
Total	23	-	-	-
R ²	-	0.2793	0.6603	0.2490
C.V.	-	18.18	49.34	14.86

Cuadro 6b. Análisis de varianza del efecto de la aplicación de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* sobre las variables: número de J₃ g⁻¹ de raíz (J₃), número de J₄ g⁻¹ de raíz (J₄), número de hembras maduras g⁻¹ de raíz (HM), UFC del hongo en suelo (UFCS) y raíces (UFCR) en plantas de frijol var. Flor de Mayo criollo.

F.V.	G.L.	J₃	J₄	HM	UFCS	UFCR
Modelo	5	0.0001**	0.0010**	0.0289**	0.0001**	0.0001**
Error	18	-	-	-	-	-
Total	23	-	-	-	-	-
R ²	-	0.7680	0.6538	0.4745	0.9441	0.9141
C.V.	-	19.83	23.09	64.86	32.68	37.01

**Altamente significativo C.V. = Coeficiente de Variación F.V. = Fuente de Variación
G.L. = Grados de Libertad

Con base en la prueba de comparación de medias de Tukey, y aunque no hubo diferencias significativas en el peso seco de follaje de las plantas entre los tratamientos, se observa que el aislamiento IZ1 con la concentración más alta de clamidosporas en suelo (IZ1-DA) fue el que presentó el mayor peso seco del follaje, entre 8 y 4% más que el de las plantas donde se aplicó la concentración más baja de clamidosporas del

mismo hongo (IZ1-DB) y el aislamiento de referencia (SC1), respectivamente; de igual manera, dichas plantas presentaron 4% más peso seco de follaje que el de aquellas del testigo absoluto, y 28% más que el de las plantas donde se aplicó el nematicida (TQ) (Fig. 7).

En lo que al peso fresco de raíces se refiere, tampoco se detectaron diferencias significativas; sin embargo, las plantas inoculadas con el aislamiento SC1 fueron las que presentaron el mayor peso, únicamente 2.6% más que las plantas inoculadas con el aislamiento IZ1 a alta concentración de clamidosporas en suelo, pero 10.3 y 12.9% mayor que el de las plantas donde se aplicó el nematicida y el hongo a baja concentración de clamidosporas, respectivamente (Fig. 8). Ahora bien, si se comparan dichas plantas con las del testigo absoluto, el peso fresco de raíces de las primeras fue 20.6% mayor que el de éstas últimas.

En el caso del Índice de Agallamiento, sí se detectaron diferencias altamente significativas (Tukey, $\alpha < 0.01$) entre tratamientos, ya que las plantas que contenían únicamente a *N. aberrans* y sin la aplicación de tratamiento alguno, presentaron el mayor índice, seguidas de las que se les aplicó solamente Vermicomposta (TA+V) y el nematicida (TQ). En la Fig. 9, se puede observar que el índice de agallamiento se redujo hasta en 81.2% en las raíces de plantas donde se aplicó el aislamiento IZ1, tanto a baja como a alta concentración de clamidosporas en suelo, en comparación con las plantas de los testigos (absoluto, con vermicomposta y con nematicida); cabe mencionar que la reducción del índice de

agallamiento al aplicar el aislamiento zacatecano, fue muy similar a la observada con el aislamiento de referencia (SC1) y probado ya con anterioridad en cultivos como chile y jitomate contra *N. aberrans* (Pérez *et al.*, 2007; Pérez, 2008).

En el caso del número de estadios vermiformes g^{-1} de raíz, cabe mencionar que en el momento de la evaluación se detectó un mayor número de juveniles, J_3 que de J_4 ; a pesar de ello, se presentaron diferencias altamente significativas (Tukey $\alpha < 0.01$) en el número de individuos de ambos estadios entre tratamientos. Las diferencias más notorias se presentaron en las raíces donde se aplicó el aislamiento SC1, ya que se presentó el menor número de J_3 y J_4 en las raíces (Fig. 10). Al analizar el número de juveniles J_3 y J_4 en las plantas donde se aplicó el aislamiento zacatecano, tanto a baja como a alta concentración de clamidosporas, éste fue en promedio 30.5 y 43.8% menor, respectivamente, que el cuantificado en las raíces de las plantas donde se aplicó el nematicida; de igual manera, al comparar el número de juveniles en ambos tratamientos, con el observado en las raíces de las plantas del testigo absoluto, la reducción promedio en el número de juveniles fue del 48% al aplicar la dosis alta del hongo y del 36% cuando se aplicó la dosis baja.

Con relación al número de hembras maduras g^{-1} de raíz, aunque no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha < 0.05$), el

mayor número de hembras en las raíces se encontró en las plantas tratadas con el nematicida (inclusive 16.7% más que en el testigo absoluto). Por su parte, en las raíces de las plantas tratadas con los aislamientos SC1 e IZ1 a baja concentración de clamidosporas g^{-1} de suelo, e IZ1 a alta concentración, se presentó el menor número de hembras g^{-1} de raíz; en estos tratamientos la reducción en el número de hembras osciló entre el 68.4 y 70% respecto a las plantas del testigo absoluto y entre 74 y 75.4% comparado con las plantas a las que se les aplicó nematicida (Fig. 11).

En el caso de la colonización de las masas de huevos por parte del hongo, es importante mencionar que no fue posible extraer las 20 masas de huevos como lo indica la metodología descrita por Pérez-Rodríguez (2004), debido a que algunas de las agallas presentes en las raíces no mostraban aún la exposición de masas por parte de las hembras. Sin embargo, en las plantas a las que se les aplicó el aislamiento SC1, fue posible detectar la presencia del hongo, situación similar a la observada en las plantas donde se aplicó el aislamiento IZ1, a ambas concentraciones de clamidosporas. A pesar de que no fue posible cuantificar la presencia de *P. chlamydosporia* en las plantas tratadas, su presencia indica que el hongo estuvo presente durante el transcurso del experimento, lo cual se manifestó en los efectos observados en las plantas tratadas con ambos aislamientos.

Para el caso de UFC de *P. chlamydosporia* en raíces, se observó a los hongos creciendo sólo en las cajas donde se procesaron raíces de plantas

inoculadas con éstos, tal y como era de esperarse. El mayor número de UFC en raíces correspondió al tratamiento con el aislamiento IZ1 a alta concentración (510 UFC g⁻¹ de raíz). En cuanto al número de UFC en suelo, también fue posible detectar al hongo sólo en los diferentes tratamientos donde éste se inoculó, presentándose el mayor número en los tratamientos correspondientes a los aislamientos SC1 e IZ1 a alta concentración (240 y 300 UFC g⁻¹ de suelo, respectivamente); es importante mencionar que en ambos casos se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha= 0.05$) (Fig. 12).

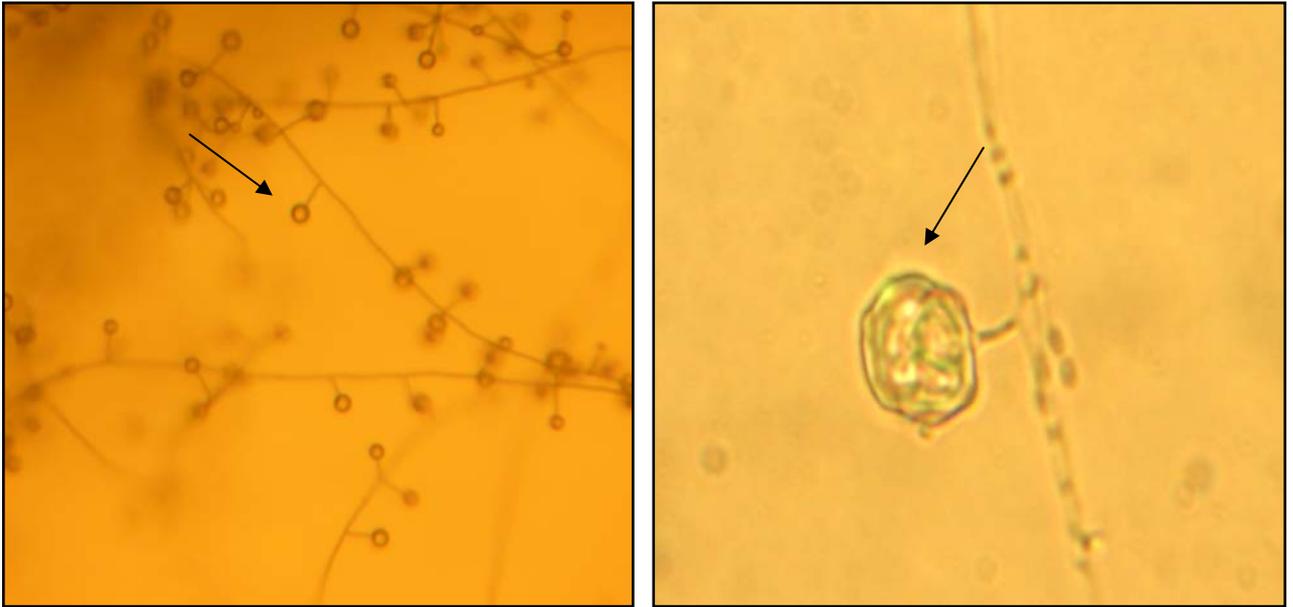


Fig. 1 *P. chlamydosporia* A) Conidios portados en conidióforos B) Clamidospora.



Fig 2. *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* obtenido de una muestra de suelo de La India 2. A) Conidióforos portando conidios en cabezuela. B) Clamidosporas.

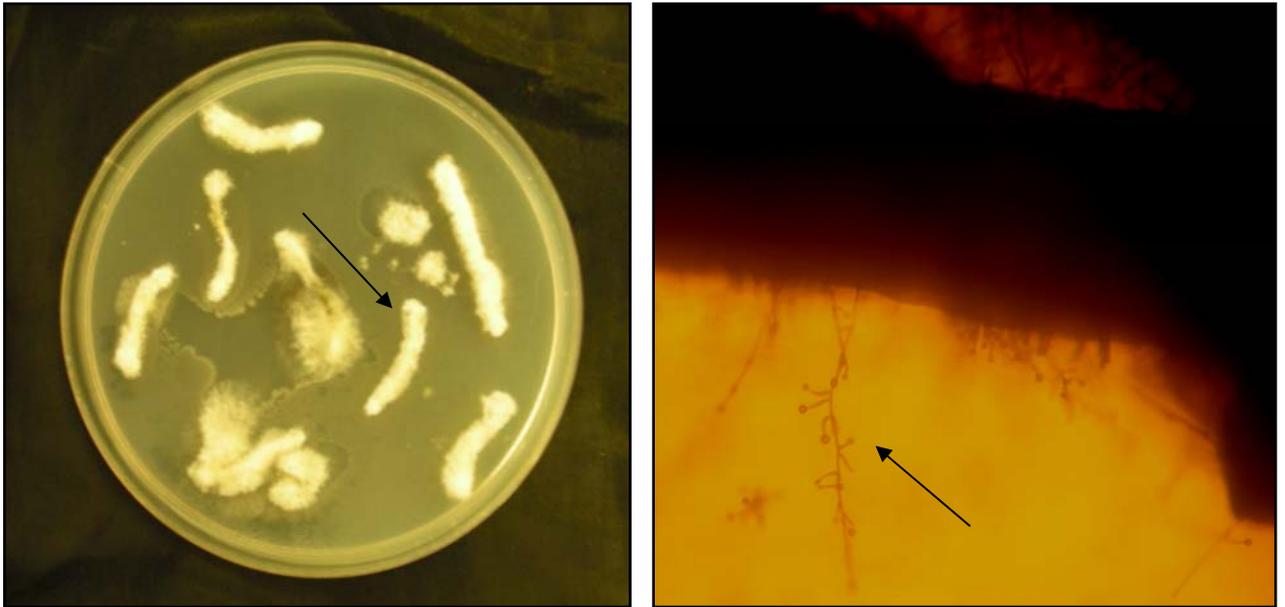


Fig 3. A) Aspecto de una caja Petri con segmentos de raíces de calabaza colonizadas por *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. B) Observación de la colonización de raíces por parte del hongo, bajo el microscopio de luz (40X).



Fig 4. A) Aspecto de una caja Petri con segmentos de raíces de frijol (var. Flor de Mayo criollo) colonizadas por *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. B) Observación de la colonización de raíces por parte del hongo, bajo el microscopio de luz (40X).



Fig 5. Huevo de *N. aberrans* parasitado por el aislamiento IZ1 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, después de transcurridos los cuatro días de incubación, bajo el microscopio de luz (40X). Alrededor del huevo parasitado es posible observar conidióforos portando conidios.

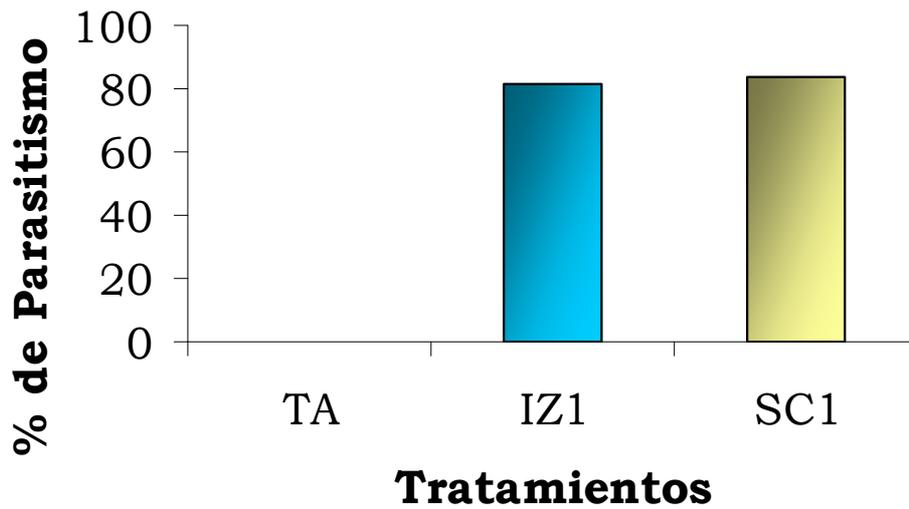


Fig 6. Parasitismo de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* probados sobre huevos de una población de *N. aberrans*. TA= Testigo absoluto, IZ1= aislamiento nativo de Zacatecas, SC1= aislamiento obtenido por Flores (2003).

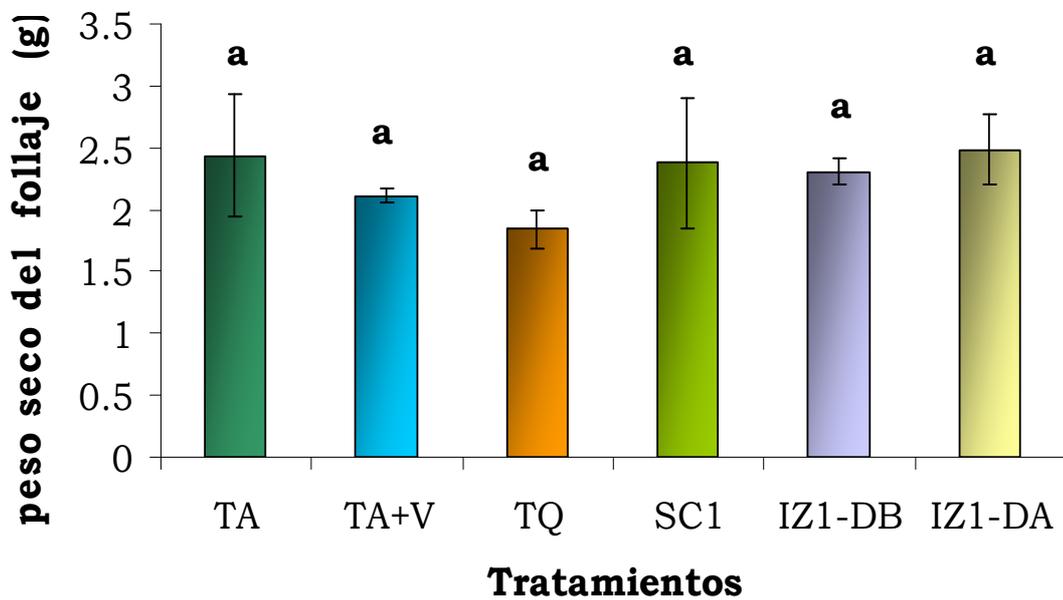


Fig 7. Peso seco del follaje de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo criollo 60 días después de la siembra, con la aplicación o no de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a diferentes concentraciones de clamidosporas.

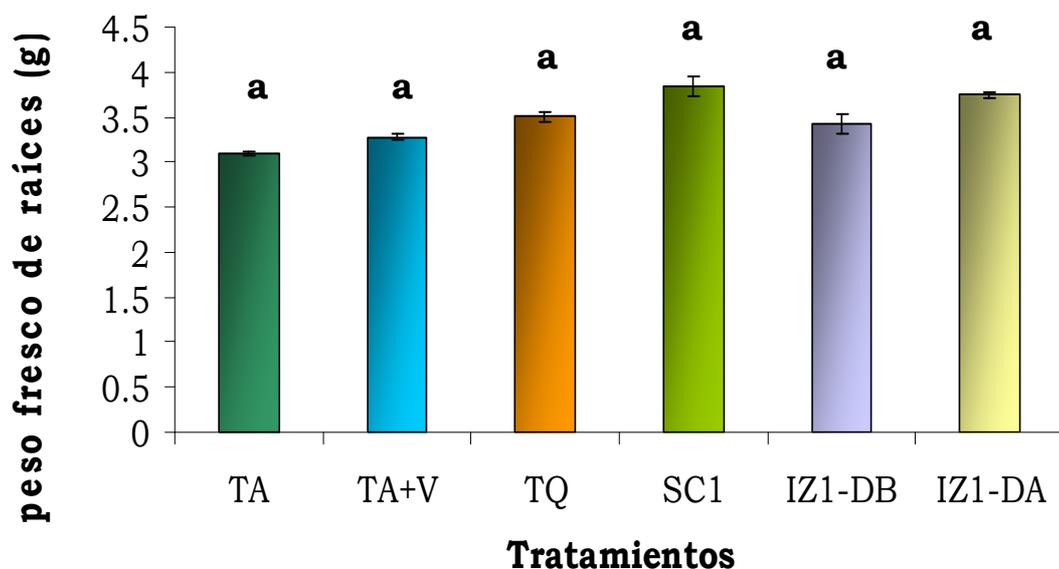


Fig 8. Peso fresco de raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo criollo 60 días después de la siembra, con la aplicación o no de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a diferentes concentraciones de clamidosporas.

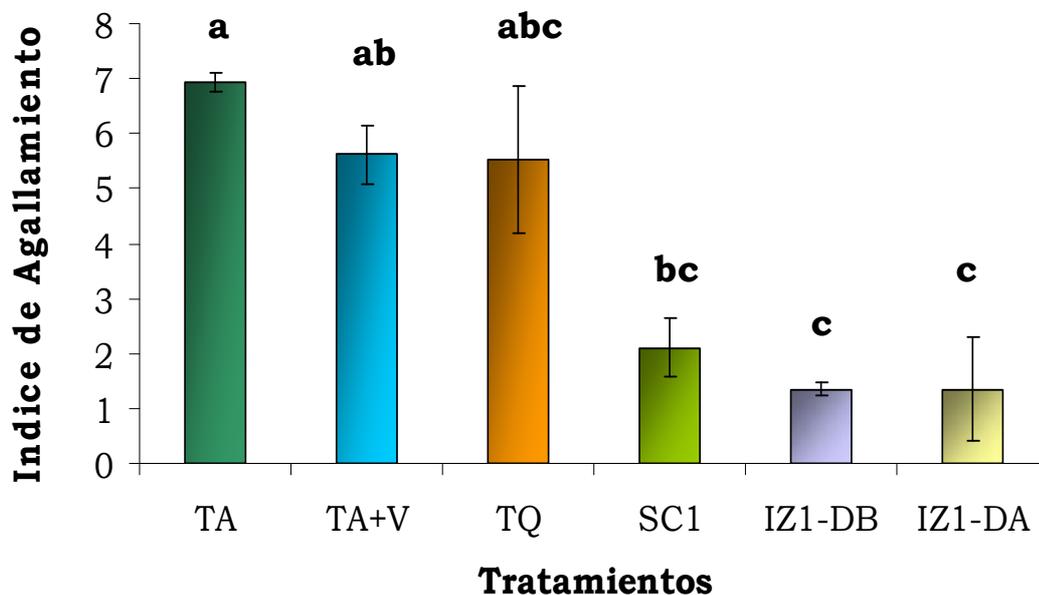


Fig 9. Índice de Agallamiento de raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo criollo 60 días después de la siembra, con la aplicación o no de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a diferentes concentraciones de clamidosporas.

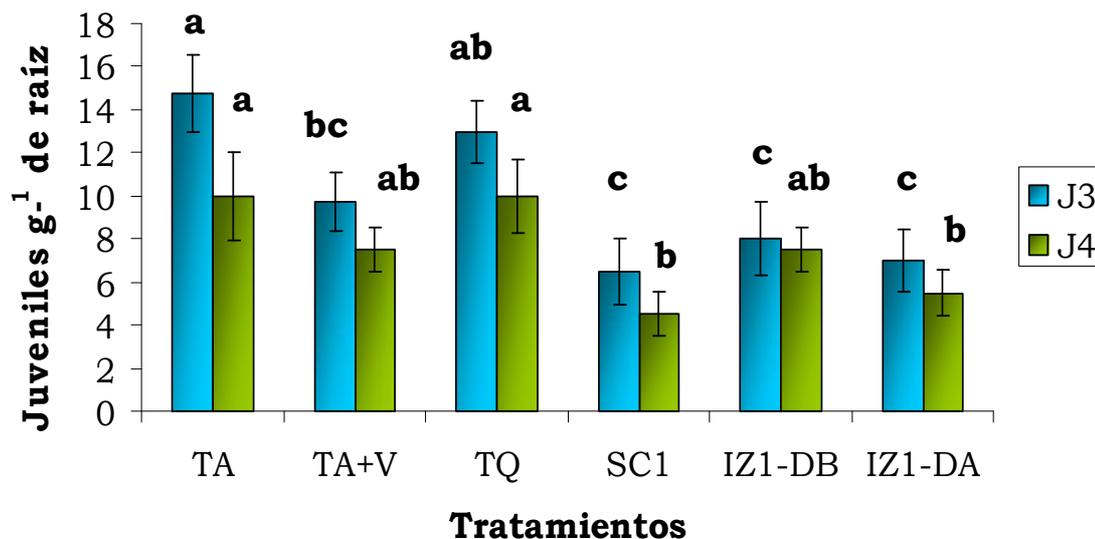


Fig 10. Número de J₃ y J₄ en raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo criollo 60 días después de la siembra, con la aplicación o no de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a diferentes concentraciones de clamidosporas.

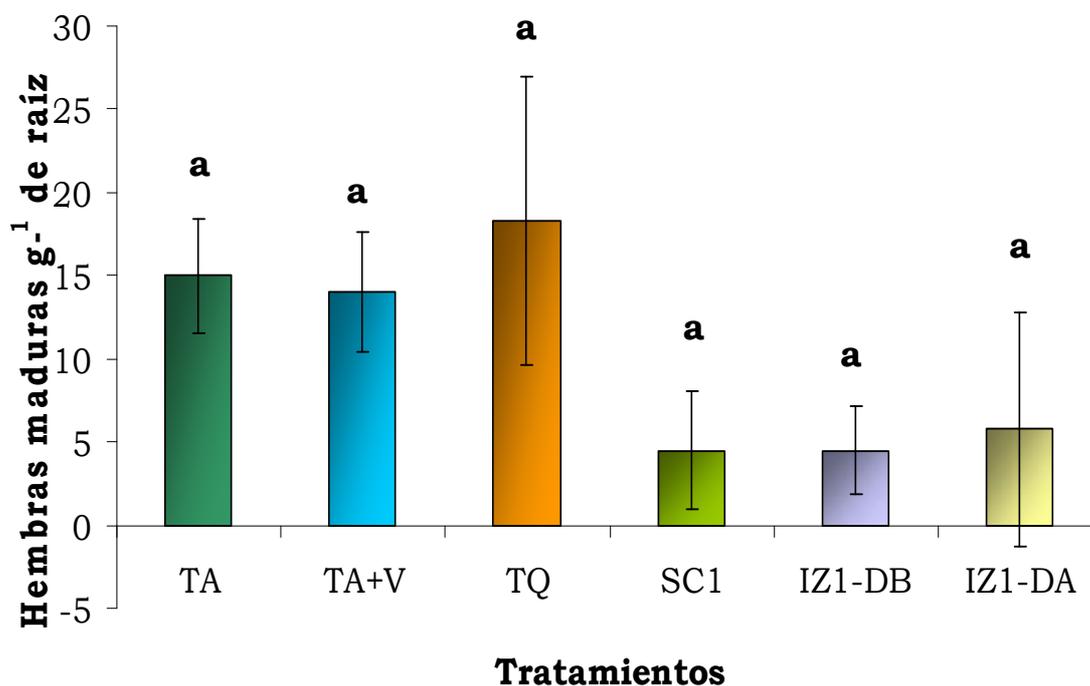


Fig 11. Número de hembras maduras g⁻¹ de raíz en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo criollo 60 días después de la siembra, con la aplicación o no de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a diferentes concentraciones de clamidosporas.

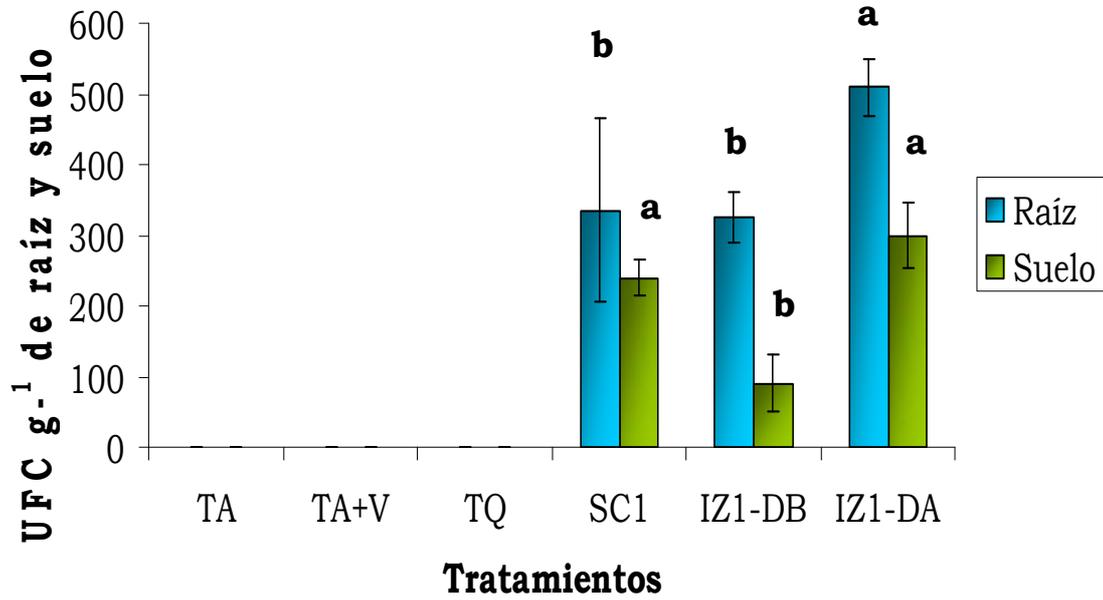


Fig 12. UFC de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en suelo y raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Flor de Mayo criollo 60 días después de la siembra, con la aplicación o no de dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a diferentes concentraciones de clamidosporas.

5. DISCUSIÓN

Derivado de los muestreos de suelo realizados en parcelas naturalmente infestadas con *Nacobbus aberrans* dentro del estado de Zacatecas, se obtuvo un aislamiento que se identificó como *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, siendo éste el primer reporte de la presencia de este hongo nematófago en suelos de aquél estado.

Respecto a las pruebas de parasitismo de huevos del nematodo realizadas en laboratorio, el aislamiento IZ1 parasitó por arriba del 80%, lo que lo hace un aislamiento potencial como agente de control biológico. Al comparar el aislamiento zacatecano (IZ1) con el aislamiento estándar (SC1) probado en el presente estudio, se observó que el primero presentó 2.4% mayor parasitismo de huevos; a diferencia de lo reportado por Doroteo (2006) y Franco-Navarro *et al.* (2006), para el aislamiento SC1, quién mostró un porcentaje de aproximadamente 80%.

Por otro lado, Flores (2003) realizó también esta prueba utilizando huevos de una población de *N. aberrans* de Zacatecas y encontró que el hongo (aislamiento SC1) parasitó 71% de los huevos, esto es 13 y 15.5% menos que los aislamientos IZ1 y SC1 obtenidos en éste trabajo, esto quizá se debe a que ambos aislamientos estuvieron expuestos a diferentes condiciones, como por ejemplo la época del año en la que se desarrollaron los experimentos y a que el aislamiento IZ1 es la primera vez que fue evaluado.

En lo que se refiere a otros trabajos donde se realizaron pruebas de parasitismo de huevos pero de nematodos agalladores (*Meloidogyne*), Hidalgo *et al.* (2000) encontraron que los porcentajes de parasitismo de *Meloidogyne incognita*, fueron entre 53 y 73%, para aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Por su parte, De Leij y Kerry (1991), reportaron un parasitismo de 59% sobre huevos de *M. arenaria*, en plantas de tomate a nivel de invernadero, es decir 27.9 y 29.6% menos que los aislamientos IZ1 y SC1, de este trabajo, lo cual puede sugerir que en este estudio los resultados fueron favorables para esta variable, a pesar de que se trate de diferentes nematodos.

En relación a los resultados de la Prueba de Colonización de raíces, cabe mencionar que los resultados permitieron reforzar el conocimiento sobre el potencial del aislamiento nativo y además pueden considerarse como novedosos, ya que la prueba misma se realizó por primera vez tanto en cultivos empleados en esquemas de rotación para el manejo del nematodo falso nodulador, como en variedades de frijol con diferente grado de susceptibilidad; esta estrategia fue diferente a la seguida por Flores (2003) y Pérez-Rodríguez (2004 y 2008), quienes sólo se probaron en plantas altamente susceptibles a *N. aberrans* y que eran el objeto mismo de sus investigaciones.

Por su parte, Hidalgo *et al.*, 2000 encontraron que los aislamientos de *P. chlamydosporia* inoculados en suelo, obtenidos en regiones donde se cultiva café y que fueron probadas en plantas de tomate infestadas con

Meloidogyne incognita a nivel de invernadero, son igualmente capaces de colonizar las raíces de las plantas hospedantes.

De manera general y con base en los resultados de la prueba de efectividad biológica realizada en invernadero, el aislamiento IZ1 inoculado (15,000 cl g⁻¹ de suelo), fue efectivo para reducir la población del nematodo, ya que las plantas tratadas con este aislamiento presentaron la mayor biomasa, una reducción del daño en el sistema de raíces y una cantidad de nematodos menor que el resto de los tratamientos. Esto pudo reforzarse al comprobar la presencia del hongo en suelo y en las raíces de las plantas de frijol (Flor de Mayo criollo), ambas condiciones, indispensables para asociar el efecto del hongo sobre la población de *N. aberrans* y por tanto, en la reducción de daños y el favorecimiento de un mejor desarrollo de las plantas de frijol.

En relación al peso seco del follaje, las plantas de frijol en las que estaban presentes el aislamiento zacatecano a dosis alta y el SC1, fueron las que mostraron la mayor biomasa. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pérez-Rodríguez (2004 y 2008) en tomate y chile, respectivamente; en dichos estudios se encontró que las plantas donde estaba presente el aislamiento SC1 a una concentración de 15,000 cl g⁻¹ de suelo, presentaron mayor altura y biomasa, quizá en gran medida por el hecho de haber contenido el efecto dañino del nematodo sobre las plantas y permitiendo con ello que su desarrollo se diera en condiciones más favorables.

Aunque se esperaba que el Testigo absoluto con vermicomposta, redujera el impacto ocasionado por el nematodo, no fue así, lo que puede indicar que esta estrategia de control pudo haber modificado las condiciones del suelo, por lo que no fueron las adecuadas para el desarrollo de las plantas, pero si para el establecimiento del nematodo como lo observado por Pérez-Rodríguez (2008), en el cultivo de chile, quién concluye que los mejores tratamientos fueron aquellos donde se aplicó únicamente vermicomposta y no donde se hicieron combinaciones con el hongo.

Con respecto al efecto que se obtuvo al inocular ambos aislamientos del hongo (IZ1 y SC1), los resultados indican que el número de juveniles se redujo significativamente; esto coincide con lo reportado por Pérez-Rodríguez (2004), al observar que el aislamiento SC1 a concentración alta redujo el número de juveniles de *N. aberrans* en plantas de tomate.

Los resultados de este trabajo demostraron ser altamente significativos, de manera similar a lo que encontró De Leij *et al.* (1993b), quienes observaron una reducción del 50% de los juveniles con respecto al Testigo en el patosistema *M. incognita*-tomate en presencia de *P. chlamydosporia*.

Estos mismos tratamientos inoculados con ambos aislamientos del hongo (SC1 e IZ1), mostraron el menor número de hembras maduras g⁻¹ de raíz y presentaron diferencias significativas entre tratamientos, lo que se asemeja a lo reportado por Mousa *et al.* (1995), que observaron que en

suelo inoculado con *P. chlamydosporia*, hubo una reducción de hasta el 80% de las hembras de *Meloidogyne spp.*; aunque en este trabajo se encontró que se redujo entre 60 y 73%. Estos resultados, también coinciden con lo reportado por Pérez-Rodríguez (2004), que determinó que en las plantas que fueron inoculadas con el hongo hubo menor número de hembras maduras.

La prueba de parasitismo de huevos no pudo llevarse a cabo por diversas razones (), pero mediante la prueba de colonización realizada con masas de huevos fue posible detectar al hongo, sólo en las plantas inoculadas con los aislamientos SC1 e IZ1 a diferentes concentraciones de clamidosporas. Más allá del número obtenido de masas de huevos colonizadas por el hongo, el haber reaislado ambos aislamientos a partir de éstas fue una prueba fehaciente de la presencia del hongo durante el ensayo y de su influencia en los resultados encontrados.

De las plantas inoculadas con ambos aislamientos de *P. chlamydosporia* (SC1 e IZ1), tanto a alta como a baja concentración de cl g^{-1} de suelo, el hongo pudo reaislarse de suelo y de raíces, tal y como ha sido reportado por Pérez-Rodríguez (2004), Hernández (2005), Pérez-Rodríguez *et al.* (2007) y Pérez-Rodríguez (2008). Los tratamientos que presentaron una mayor cantidad de UFC en suelo y en raíces, fueron aquellos donde se incorporaron los aislamientos SC1 e IZ1 a alta concentración de clamidosporas, parecido a lo que reportó Pérez-Rodríguez (2004) y Pérez-Rodríguez (2008). Tal como era de esperarse, en los tratamientos donde no fue inoculado el hongo no fue posible detectar su presencia.

6. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un aislamiento nativo de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* a partir de suelo colectado en la localidad de La India 2, Zac., siendo éste el primer registro para el estado de Zacatecas y uno más que se suma a los ya reportados en otras regiones del país.
- El aislamiento nativo de Zacatecas (IZ1), colonizó el 100% de las raíces de los cultivos probados en el estudio y parasitó el 81.8% de los huevos de la población de *N. aberrans* utilizada.
- La aplicación del aislamiento IZ1 a concentración alta de clamidosporas por gramo de suelo, favoreció mayor biomasa de las plantas, incremento en el peso fresco de raíces, así como reducción significativa en el índice de agallamiento y menor número de nematodos por gramo de raíces (estadios J3, J4 y hembras maduras).
- Ambos aislamientos (SC1 e IZ1), se detectaron en las masas gelatinosas de huevos del nematodo, lo que confirma la presencia de los dos aislamientos y su relación con los resultados observados a lo largo del experimento. El mayor número de UFC en raíces y suelo se observaron en el tratamiento donde se aplicó el aislamiento IZ1 a alta concentración.
- Se confirma que el aislamiento SC1, probado con anterioridad, y que el nuevo aislamiento nativo de Zacatecas (IZ1) pueden ser considerados como potenciales agentes de control biológico del nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans* en el cultivo de frijol.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar muestreos en algunas otras zonas productoras de frijol del estado de Zacatecas, con el fin de obtener más aislamientos del hongo, en suelos naturalmente infestados con *N. aberrans*.
- Repetir el experimento, bajo condiciones de invernadero, pero en los meses calurosos del año, con el fin de comparar resultados.
- Probar el aislamiento nativo de Zacatecas en los cultivos de jitomate y chile.
- Llevar el experimento a nivel de campo, para complementar y corroborar los datos obtenidos a nivel de invernadero.

8. LITERATURA CITADA

- Acosta – Gallegos, J.A., Vargas – Vázquez P. and White W. J. 1996. Effect of sowing date on the growth and seed yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in highland environments.
- Anónimo. 1986. SARH – Subsecretaría de Desarrollo y Fomento Agropecuario Forestal. 1986. Sistema Producto “El Frijol”. Dirección General de Política y Desarrollo Agropecuario y Forestal. México. 50 p.
- Anónimo. 2000. INEGI-CONAL, 2000. Boletín de Información Oportuna. BIOSA.
- Brown, R.H and Kerry, B.R. 1987. Principles and Practice of Nematode Control in Crops. Academic Press, Australia. 447p.
- Byrd, D.W.Jr., Kirkpatrick, T. and Barker, K.R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15: 142-143.
- Canto-Sáenz, M. 1992. Life cycle and pathogenicity of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. Pp. 113-127 in: Gommers J. F. and P.W. Th. Maas eds. *Nematology from molecule to Ecosystem*. European Society of Nematologists: Invergowrie, Dundee.
- Cid del Prado, V. I. 1985. Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. En Marban, M. N. y Thomson J. I. (Eds.) *Fitonematología Avanzada I*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. Pp 57-65.
- Cid del Prado, V. I. 1986. Morphological study of *Nacobbus* spp. including four populations from Mexico using SEM. *Journal of Nematology* 18: 603.

- Cid del Prado, V. I., Manzanilla L. R. H., Hernández J. A. y Franco E. G. 1993. Determinación de razas de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944 mediante el uso de rango de hospedantes. p.8 en: L. Fucikovsky and M. Santos, eds. Avances de Investigación. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México

- Cid del Prado, V. I., Manzanilla, L. R. H., Cristóbal, A. J., Franco, A. G. E. y Carrillo, F. C. 1995. Dinámica poblacional de *Nacobbus aberrans* en parcelas con cultivo de jitomate, maíz y maleza. en: Avances en la Investigación. IFIT. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. Pp 178-180.

- Cid del Prado, V. I., Evans, K., Manzanilla, L. R. H., Cristóbal, A. J., Franco, A. G. E y Flores, C. R. 1996. Gama de hospedantes de poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. Avances de Investigación. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. p 107.

- Cid del Prado, V. I., Manzanilla, L. R. H., Cristóbal, A. J. y Franco, A. G. E. 1997. Dinámica poblacional de *Nacobbus aberrans* en parcelas de tomate, maíz y maleza. Avances de Investigación. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. Pp 169-171.

- Costilla, M. A. y Gonzáles O. S. 1985. Grado de susceptibilidad y resistencia de plantas cultivadas y no cultivadas al falso nematodo del nudo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944 en la Argentina. Pp. 21-25 en: Investigaciones Nematológicas en Programas Latinoamericanos de Papa. VOL. 1. J. Franco and H. Rincón, eds. Internacional Potato Center. Lima, Perú.

- Cristóbal A. J., I. Cid del Prado-Vera, N. Marbán-Mendoza, G.P. Sánchez, G. Mora-Aguilera y L.R. Manzanilla. 2001. Sobrevivencia de Estadios Biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. Nematropica: 31(2): 227-233.

- Crump, D. H. and Irving, F. 1992. Selection of isolates and methods of culturing *Verticillium chlamydosporium* and its efficacy as a biological control agent of beet and potato cyst nematodes. *Nematologica* 38: 367-374.
- Cruz, M. A., Zerón F. y De la Jara F. 1987. Dispersión del nematodo fitoparásito *Nacobbus aberrans* en una región agrícola entre Actopán y Progreso, Estado de Hidalgo. P. 83 *en*: Memorias, XIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Morelia, Michoacán, México.
- De Leij, F. A. A. M. and Kerry, R. B. 1991. The nematophagus fungus *Verticillium chlamydosporium* as potencial biological control agent from *Meloidogyne arenaria*. *Review Nematol.* 14 : 157-164.
- De Leij, F. A. A. M., Kerry, R. B and Dennehy, J. A. 1993a. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent from *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in plot and micro-plot test. *Nematologica* 39: 115-126.
- De Leij, F. A. A. M., Dennehy, J. A and Kerry, R. B. 1993b. Effect of watering of the distribution of *Verticillium chlamydosporia* in soil and the colonisation of egg masses of *Meloidogyne incognita* by the fungus. *Nematologica* 39: 250-265.
- Domsh, K. H. and Gams W. 1980. Compendium of soil fungi. Vol. I. Academia Press. London. 632 p.
- Doroteo M. A. 2006. Parasitismo *in vitro* de cinco Aislamientos Mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare, Evans y Gams sobre *Nacobbus aberrans* y estandarización de un método para su producción masiva. Tesis de Licenciatura. Ingeniero Agrícola. FES. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, U.N.A.M. 40p.
- Flores, C.R. 2003. Búsqueda y aislamientos de algunos hongos nematófagos para el control de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne

y Allen, 1944 en México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México. 89p.

- Franco-Navarro, F., Pérez, R. I., Doroteo, M. A., Vilchis, M. K., Hernández, P. M. A. González, C. B. y Miranda, D. J. 2006. Estado actual del conocimiento de *Pochonia chlamydosporia* en México. Memorias del XXIX Congreso Nacional de Control Biológico, Manzanillo, Colima, México.

- Gams, W. and Zare, R. 2001. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. III. Generic classification. Nova Hedwigia. 72: 329-337.

- García, C. J. y Trejo G. 1995. Daño causado por *Nacobbus aberrans* en tres variedades de frijol. Revista Mexicana de Fitopatología 13: 154.

- Hernández, A. J. 2001. Respuesta de Genotipos de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Nacobbus aberrans*. Tesis Maestra en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad, Montecillo, Edo. de México. p 75.

- Hernández, P. M. A. 2005. Control biológico de *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944 mediante *Pochonia chlamydosporia* (Goddard, Zare & Gams) en Chile (*Capsicum annum* L.). Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 85 p.

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

- Kerry, R. B. 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. 90p.

- Manzanilla, L. R. H., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R. N., Lehman, P. S., Cid del Prado, V. I., Souza, R. M. and Evans, K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne y Allen, 1944 (Nematode: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *NEMATROPICA*: 32: 209-232.
- Mendoza de Gives, P., Zavaleta M. E., Herrera, R. D. y Romero, Q. H. 1994. *In vitro* trapping capability of *Arthrobotrys* spp. of infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Nacobbus aberrans*. *Journal of Helminthology* 68: 223-229.
- Montes, B. R. 1986. Especies de *Meloidogyne* y *Nacobbus* presentes en Oaxaca, sus niveles de daño y rango de hospederos. *Memorias del XIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. 56 p.
- Morgan, J. G. y Rodríguez, K. R. 1985. Phytonematode pathology: fangal modes of action a perspective. *Nematropica* 15: 107-114.
- Mousa, M. E., Basiony, M. A. and Mahdy, E. M. 1995. Control of *Meloidogyne javanica* by *Verticillium chlamydosporium* on tomatoes. *Afro-Asian Journal of Nematology* 5:113-115.
- Pérez-Rodríguez I. 2004. Eficiencia de cinco aislamientos del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* Goddard para el control de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen 1944, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Tesis Ingeniero Agrónomo. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 29, Xocoyucan, Tlaxcala. 64p.
- Pérez-Rodríguez I. 2008. Control Integrado de *Nacobbus aberrans* en Chile (*Capsicum annum* L.) bajo condiciones de Invernadero y Campo. Tesis Maestro en Ciencias en Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México, México. 66p.
- Pérez-Rodríguez, I., Doroteo-Mendoza, A., Franco-Navarro F., Santiago-Santiago V. y Montero-Pineda A. 2007. Isolates of *Pochonia*

chlamydosporia var. *chlamydosporia* from Mexico as potencial biological control agents of *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 37: 127-134.

- 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. Colegio de Postgraduados. Instituto de Fitosanidad, Montecillo, Edo. de México. 150p.

- Toledo, R. J. C., Sosa – Moss C. y Zavaleta M. E. 1993. Gama de hospederos de cinco poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 23: 105-108. |

- Torres, C. R. A., Tovar F. J. y Zerón F. 1994. Nuevo registro de *Nacobbus aberrans* para la republica mexicana. p. 71 en: Memorias, XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Cuernavaca Morelos, México.

- Treviño, C., Gowen S., Trudgill D. y Fargette M. 1998. Densidades poblacionales de nematodos fitoparásitos en campos hortícolas del Ecuador. *Nematropica* 28: 148.

- Zamudio, G. V., Carballo A. y Marbán M. N. 1990. Gama de hospedantes y evaluación del daño de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen 1944, en hortalizas comerciales. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8: 9-12.

- Zare. R., Gams W. y Evans C. H. 2001. A Revision of *Verticillium* section *Postrata*. V. The genus *Pochonia* with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia* 73: 51 – 86.