



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA

UNAN - MANAGUA

RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO

INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD “LUIS FELIPE MONCADA”

DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO

MONOGRAFÍA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:

Licenciada en Microbiología

TEMA:

Evaluación del uso de los hongos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacium* como agentes de biocontrol en nematodos fitopatógenos de cultivos de café en invernaderos, Managua, Nicaragua, junio-diciembre 2021.

Autora:

Br. Roshell Nohemí Rizo Obregón

Tutor:

Lic. Henriques José Malespín Joaquim
Microbiólogo - Jefe de laboratorios Biotechnica S.A.

Asesor:

Msc. Francisco Romero Oviedo
Docente POLISAL UNAN-Managua

Managua, 22 de febrero 2022

VALORACIÓN DEL TUTOR

La investigación continúa y el desarrollo de tecnologías que se aplican a diario para suplir las necesidades de los diferentes sectores económico de un país, deben de estar siempre de la mano con las universidades y sus estudiantes. Por lo antes mencionado, trabajos como el presente, que demuestran con bases científicas la inmensurable necesidad de un cambio de cultura agrícola, haciendo uso de técnicas biotecnológicas como la aplicación de microorganismo para controlar parásitos patógenos de plantas se hacen de suma importancia e impacto.

El presente trabajo es el resultado de la fusión del sector biotecnológico industrial nicaragüense (**Biotechnica S.A**) y la academia superior (**UNAN-Managua**) culminando en una monografía que abre la ventana a nuevos campos de investigación, la validación de una tecnología nueva que se introduce en nuestro país.

Me permito en modalidad de tutor felicitar a la autora **Roshell Nohemí Rizo Obregón** por dicho trabajo monográfico, por realizar una investigación que involucra distintas áreas de su carrera a la vez, lo que evidencia su conocimiento en temas de micología, parasitología, calidad microbiológica y biotecnología, así como por lograr la calidad del presente trabajo, alineando sus directrices investigativas con las necesidades sociales.

Culmino recalcando una vez más la importancia y el impacto que la misma monografía genera en la comunidad académica y social-laboral.

Lic. Henriques J. Malespin Joaquim

Microbiólogo – Biotechnica S.A.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que han formado parte de este proceso tan importante en mi vida. Primeramente, quiero agradecer a mi familia, a mis padres Noemi Obregón y José Raúl Rizo.

De manera especial debo agradecer a todo el equipo de Biotechnica S.A., al Lic. Henriques Malespín por aceptarme como estudiante bajo su dirección y por creer en mí como investigadora. El apoyo y la confianza que han depositado en mí han sido esenciales en el proceso de la elaboración de mi tesis y en mis estudios de grado.

Le agradezco también al Msc. Francisco Romero por las recomendaciones y asesorías en todo el proceso. También quiero agradecer a mis compañeros y amigos de universidad por el apoyo que me dieron a lo largo de estos cinco años.

Finalmente, a todos mis maestros que me apoyaron con asesorías, cursos y dudas en todo el transcurso de la carrera.

Después de más de cinco años de estudios, tengo que decir que 'La vida puede enseñarte más de lo que puedes imaginar'. No importa lo ridículo que sea, así es la vida. Me gustaría agradecerme a mí misma por sobrevivir de una vida más parecida a una aventura o a un juego. Aquí, diría que todos los sufrimientos eventualmente se convertirán en una parte de mi cuerpo, pero me harán más fuerte. Al mismo tiempo, sin el apoyo inquebrantable de mis seres queridos, no podría superar todos los problemas que encontré. Una vez más, muchas gracias por todo su apoyo continuo durante los buenos y los malos momentos.

¡Muchas gracias!

Roshell Rizo

Dedicatoria

A todas las mujeres científicas que me inspiraron a convertirme en una, siendo la principal mi madre. A mi abuela, quien crio a dos científicas con solo una máquina de coser. A mi padre por el ser hombre más fuerte y dedicado que conozco, gracias por enseñarme tu amor por el campo.

RESUMEN

Se realizó un estudio con el objetivo de evaluar a los hongos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum* como agentes de biocontrol en nematodos fitopatógenos de café. Siguiendo un diseño experimental de Bloques Completos al Azar (BCA) que consto de dos bloques homogéneos de cuatro tratamientos con cinco repeticiones cada uno. La terapia de hongos se obtuvo a partir de la aplicación de Bioconsorcio Nematicida ®. Se utilizo el método de embudo de Bearman modificado para la extracción de nematodos, para el cultivo de Hongos se incubaron en agar papa dextrosa y la observación de estructuras características por tinción de azul de lactofenol. Se identificaron en total 6 géneros de nematodos fitopatógenos de interés para el cultivo siendo *Meloidogyne spp.* y *Pratylenchus*. como las plagas más comunes. Después de la aplicación de los tratamientos se obtuvo una tasa de reducción de 80.5% sobre el testigo. El recuento de los hongos fue de 7×10^4 UFC/ g suelo y 4×10^3 UFC/g suelo para *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* respectivamente. También se presentaron post tratamiento nematodos colonizados por hongos con un porcentaje de hasta el 22.50%. Los resultados demuestran que los microorganismos son una alternativa eficaz para el control de nematodos reduciendo la población de fitopatógenos.

Palabras claves: Control biológico, *Coffea arabica*, Nematodos fitopatógenos, *Pochonia chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum*

ABSTRACT

A study was carried out to evaluate *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* as biocontrol agents in coffee phytopathogenic nematodes. Following an experimental design of Complete Random Blocks (BCA) that consisted of two homogeneous blocks of four treatments with five repetitions each. The fungal therapy was obtained from the application of Bioconsorcio Nematicida ®. A modified Bearman funnel method was used for the extraction of nematodes, for the culture of the fungi they were incubated in potato dextrose agar and the observation of characteristic structures by lactophenol cotton-blue staining. A total of 6 genera of plant-parasitic nematodes of interest for cultivation were identified, being *Meloidogyne sp.* and *Tylenchus sp.* the most common pests. After applying the treatments, a reduction rate of 80.5% was obtained. The count of the fungi was 7×10^4 ufc/ g soil and 4×10^3 ufc / g soil for *P. chlamydosporia* and *P. lilacinum* respectively. Nematodes colonized by fungi also appeared post-treatment with a percentage of 22.50%. The results show that microorganisms are an effective alternative for nematode control, reducing the population of plant-parasitic nematodes on crops.

Keywords: Biological control, *Coffea arabica*, Plant-parasitic nematodes, *Pochonia chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	11
TABLAS	11
FIGURAS	11
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	13
INTRODUCCIÓN	13
ANTECEDENTES	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	18
DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	18
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	19
SISTEMATIZACIÓN DEL PROBLEMA	19
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVOS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
HIPÓTESIS	22
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	23
CULTIVO DE CAFÉ	23
<i>Caturra</i>	23
NEMATODOS FITOPATÓGENOS	24
<i>Nematodos Agalladores (Meloidogyne spp.)</i>	23
Ciclo de Vida	23

Morfología.	25
<i>Nematodos de la Lesión de la Raíz (Pratylenchus spp.)</i>	27
Ciclo de Vida.	27
Morfología.	28
<i>Nematodo Espiral (Helicotylenchus spp.)</i>	28
Ciclo de Vida.	28
Morfología.	29
<i>Nematodo Reniforme (Rotylenchus spp.)</i>	30
Ciclo de Vida.	31
Morfología.	31
<i>Nematodo Daga (Xiphinema spp.)</i>	32
Ciclo de Vida.	33
Morfología.	33
<i>Tylenchus spp.</i>	34
Ciclo de Vida.	34
Morfología.	35
MANEJO DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS	35
<i>Control Químico</i>	35
Impacto de los Antihelmínticos en el Ambiente.	36
<i>Control Cultural</i>	37
<i>Control Físico</i>	37
<i>Control Biológico</i>	37
HONGOS BIOCONTROLADORES	38
<i>Hongos Nematófagos</i>	38
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	39
Morfología.	39
Mecanismos de Acción Nematicida.	39
<i>Purpureocillium lilacinum.</i>	41
Morfología.	41
Mecanismos de Acción Nematicida.	42
CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO	44
DISEÑO METODOLÓGICO	44
<i>Tipo de Estudio</i>	44

<i>Área de Estudio</i>	44
<i>Universo</i>	44
<i>Muestra</i>	44
<i>Tipo de Muestreo</i>	45
<i>Criterios de Inclusión y Exclusión</i>	45
DISEÑO EXPERIMENTAL	45
<i>Condiciones de Cultivo</i>	45
<i>Descripción de Tratamientos</i>	45
MATERIALES Y MÉTODOS	48
<i>Etapa 1: Identificación de Poblaciones de Nematodos Fitopatógenos</i>	48
Recolección de Muestras.	48
Extracción de Nematodos del Suelo.	49
Método de Embudo de Baermann (1917).	49
Identificación de Nematodos.	50
<i>Etapa 2: Verificación Calidad Microbiológica del Formulado Líquido Bioconsorcio Nematicida</i>	50
Caracterización de Aislados de <i>Pochonia chlamydosporia</i> y <i>Purpureocillium lilacinum</i>.	50
Concentración de Conidios por Militrito del Producto Formulado.	51
Viabilidad de los Conidios.	52
Pureza del Producto Formulado.	52
<i>Etapa 3: Efectividad de los Hongos Nematóforos <i>Pochonia chlamydosporia</i> y <i>Purpureocillium lilacinum</i> Como Biocontroladores de Nematodos Fitopatógenos</i>	53
Población Final de Nematodos y Factor de Reproducción de Acuerdo a Oostenbrink (1966).	53
Reaislamiento de <i>P. chlamydosporia</i> y <i>P. lilacinum</i> en Muestras de Suelo.	53
Prueba de Abbott (1925) Corregida.	54
<i>Etapa 4: Correlación Entre los Niveles de Eficacia de los Tratamientos de <i>Pochonia chlamydosporia</i> y <i>Purpureocillium lilacinum</i> Como Biocontroladores de Nematodos Fitopatógenos y las Variables Agronómicas de las Plantas.</i>	54
Incorporación de los Tratamientos Fúngicos al Suelo.	54
Recopilación de Datos.	55
Correlación Entre Eficacia y Variables.	55
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	57
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
IDENTIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS QUE SE ENCUENTRAN ASOCIADOS AL CULTIVO DE CAFÉ	60
CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA FORMULACIÓN DEL PRODUCTO BIOCONSORCIO NEMATICIDA	62
<i>Caracterización de Aislados de Pochonia chlamydosporia y Purpureocillium lilacinum</i>	62
<i>Concentración de Conidios por Mililitro del Producto Formulado</i>	63
<i>Viabilidad y Pureza de los Conidios</i>	63
EFFECTIVIDAD DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE <i>POCHONIA CHLAMYDOSPORIA</i> Y <i>PURPUREOCILLIUM LILACIUM</i> COMO BIOCONTROLADORES DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS DE CULTIVO DE CAFÉ EN DIFERENTES PERÍODOS DE TIEMPO	65
<i>Índice de Agallamiento, Porcentaje de Infección, Densidades de Poblaciones de</i> <i>Nematodos Inicial y Final y Población de Nematodos y J2 en 100 g de Suelo</i>	65
<i>Reducción Poblacional de Nematodos Sobre Testigos en los Tratamientos Durante el</i> <i>Período de Estudio</i>	67
<i>Reaislamiento, de P. chlamydosporia y P. lilacinum en Muestras de Suelo</i>	68
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS DE <i>POCHONIA</i> <i>CHLAMYDOSPORIA</i> Y <i>PURPUREOCILLIUM LILACIUM</i> COMO BIOCONTROLADORES DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS Y LAS VARIABLES AGRONÓMICAS DE LAS PLANTAS DE CAFÉ EN ESTUDIO	70
<i>Variables Agronómicas de las Plantas de Café en Estudio</i>	70
<i>Correlación Entre los Niveles de Eficacia de los Tratamientos y las Variables</i> <i>Agronómicas de las Plantas de Café</i>	72
CONCLUSIONES.....	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1 Tratamientos evaluados en el estudio evaluativo <i>Pochonia chlamydosporia</i> y <i>Purpureocillium lilacium</i> como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos en cultivos de café	47
Tabla 2 Lista de quipos	48
Tabla 3 Lista de medios, reactivos químicos y desechables	48
Tabla 4 Frecuencia de ocurrencia y densidad de población de los principales nematodos parásitos de las plantas registrados en café.....	60
Tabla 5 Efecto de los tratamientos en la población de nematodos y eficacia en su reducción en 100g de suelo.	66
Tabla 6 Correlación entre niveles de efectividad de <i>Pochonia chlamydosporia</i> y <i>Purpureocillium lilacinum</i> y las variables agronómicas en condiciones de invernadero.....	72

FIGURAS

Figura 1. Agallas del nematodo agallador, <i>Meloidogyne spp.</i> en raíces de pepino	25
Figura 2 <i>Meloidogyne</i>	26
Figura 3 <i>Pratylenchus</i>	29
Figura 4 <i>Helicotylenchus</i>	30
Figura 5 <i>Rotylenchus</i>	32
Figura 6 <i>Xiphinema</i>	34

Figura 7 <i>Tylenchus</i>	36
Figura 8. atrón de distribución de los tratamientos en los bloques del almacigo	46
Figura 9 Comportamientos de poblaciones de nematodos fitopatógenos durante el periodo de estudio	61
Figura 10 Evaluación de la germinación de conidios de <i>P. chlamydosporia</i> y <i>P. lilacinum</i> ..	63
Figura 11 Viabilidad y pureza de las cepas de <i>Purpureocillium lilacinum</i> y <i>Pochonia chlamydosporia</i> obtenidos de Bioconsorcio Nematicida.....	65
Figura 12 Comportamiento de reducción de población de nematodos sobre los testigos en los tratamientos durante el periodo de estudio	67
Figura 13 Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de <i>P. chlamydosporia</i> y <i>P. lilacinum</i> al final del experimento, en suelo y rizosfera de café.....	69
Figura 14 Crecimiento de plantas de café que han sido tratadas con <i>Purpureocillium lilacinum</i> y <i>Pochonia chlamydosporia</i>	71
Figura 15 Preparación, muestreo y aplicación de invernaderos controlada por investigadores IPSA.....	90
Figura 16 Montaje, preparación de diluciones seriadas y método de extracción por embudo de Bermann en muestras de suelo.....	91
Figura 17 Géneros de nematodos fitopatógenos.....	92
Figura 18 Nematodos y huevos infectados por hongos nematófagos.....	93
Figura 19 Plantas de café al inicio y al final del estudio	94

CAPÍTULO I: Introducción

INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica*), es el producto hortícola nicaragüense de importancia esencial y es la cuarta nación centroamericana comercializadora de café en todo el mundo y lidera los productos rurales, se encuentra entre los 10 mejores productos básicos; además, cuenta con 131,130 hectáreas comprometidas con el desarrollo del café, que atienden el 25% de la región agrícola pública (MAGFOR, CONACAFE, IICA, 2008).

Los nematodos fitopatógenos se denominan causantes de grandes pérdidas en todo el mundo dentro de los marcos de los sistemas productivos agrícola. Agregando que, a pesar del daño inmediato que causan estos organismos microscópicos, también ayudan al establecimiento de hongos, infecciones de microorganismos como bacterias y virus, causando en realidad perdidas más importantes (Bendezu, 2017).

Los nematodos, en su mayoría de los géneros *Meloidogyne* y *Pratylenchus*, se encuentran entre las plagas que dañan este cultivo (Herrera, et al., 2011). Existen nematodos fitoparásitos, principalmente del género *Meloidogyne spp.*, que infligen daño permanente a las raíces, afectando la producción y la calidad de los cultivos. (Herrera, Bryngelsson, & Monzón, 2011)

Se tiende a utilizar agroquímicos altamente tóxicos para el manejo de nematodos y, en particular, para el manejo de *Meloidogyne*, lo que provoca un desequilibrio en el microbioma y la fauna del suelo, lo que resulta en una reducción de la fertilidad y un aumento en la probabilidad de recurrencia de la enfermedad. Promoviendo una opción factible que asegure la sostenibilidad de la producción agrícola al tiempo que elimina los desafíos descritos anteriormente. Como resultado, el uso del control biológico permite una reducción de los tratamientos químicos, lo que resulta en la eficiencia de control de los patógenos, lo cual es significativo en el manejo integrado de los patógenos. (Bendezu, 2017).

Los hongos controladores son un factor importante en el control de enfermedades; sin embargo, no todos los hongos biocontroladores controlan al patógeno con igual eficacia, por lo que solo se deben utilizar aquellos hongos que controlen adecuadamente el fitopatógeno, es decir, el nematodo a controlar, y en las condiciones en las que se está desarrollando el cultivo. (Pavone, 2012). Los hongos *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacium* se han

encontrado que como agentes de control biológico proporcionan un control equivalente a cualquier nematicida de uso común, pero solo se han documentado pocos informes sobre su utilización comercial para controlar la enfermedad en cultivos de café en condiciones de infestación natural. Los nematicidas derivados de *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* demuestran nula toxicidad por contacto y epidemicidad, mostrando ventajas en la compatibilidad y seguridad ambiental. Por cuanto el objetivo de este trabajo investigativo es llevar a cabo un estudio para evaluar a los hongos nematófagos, *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* contra nematodos fitopatógenos del cultivo de café.

Con la intención de facilitar su lectura e interpretación, los apartados introductorios, marco teórico, diseño metodológico, resultados y discusión de esta tesis de grado se presentan agrupados por capítulos independientes, acordes con el tipo de ensayo realizado.

ANTECEDENTES

En los últimos años se ha observado un gran interés en la investigación soluciones ecológicas para el manejo y control de nematodos fitopatógenos con agentes biológicos. *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacium* emergen como nematocidas biológicos en muchos cultivos y manejo de suelos, como lo demuestra el incremento exponencial de estudios, incluyendo investigaciones nacionales como:

Pérez (2019) realizó una investigación cuyo objetivo principal fue examinar el uso de enmiendas orgánicas y controladores biológicos para el manejo de nematodos fitoparásitos vinculados a la caficultura. Escogieron dos fincas en Jinotega y construyendo dos parcelas, una con biogreen y otra sin biogreen, así como cuatro tratamientos con *Trichoderma spp.*, *Purpureocillium lilacinum*, Vydate® L y el testigo absoluto. Como consecuencia, *Meloidogyne spp.*, *Pratylenchus spp.* y *Helicotylenchus spp.* fueron los taxones con mayor densidad de población en ambas fincas. De manera similar, el tratamiento con *Purpureocillium lilacinum* logró reducir el número de nematodos, pero no tuvo efecto sobre poblaciones de *Pratylenchus spp.* y *Helicotylenchus spp.* Llegando a la conclusión que el uso de microorganismos como *Trichoderma spp.* y *P. lilacinum* en las estrategias de control de nematodos fitoparásitos deben estudiarse y considerar para los programas de manejo.

Se evaluaron las poblaciones de fitonematodos y nematodos de vida libre en cultivos de banano relacionados con el café y los árboles, en el municipio de San Ramón, Matagalpa, con el objetivo de determinar si los fitonematodos que atacan el sistema radicular del café y el banano son los mismos. Cada finca probó cuatro tratamientos: Café-Plátano-Leguminosas (CBL), Café-Plátano (CB), Café-Leguminosas (CL) y Café (C). Los datos revelaron tres géneros prominentes, siendo el mayor *Meloidogyne spp.* con 1.639, seguido de *Pratylenchus spp.* con 493, y por último *Helicotylenchus spp.* con 243. El género *Pratylenchus spp.* fue identificado en 100g de raíz de banano con 1.319, seguido del género *Helicotylenchus spp.* con 733, y por último el género *Radopholus spp.* con 456. (Castellón, 2014)

Simultáneamente, se descubrieron precedentes internacionales, como el estudio de Sarven et al. (2019), que evaluó la eficacia de varias dosis de *Purpureocillium lilacinum* PLSAU-1 (*P. lilacinum* PLSAU-1) contra el patógeno de raíz *Meloidogyne incognita* a varios niveles de inóculo. Antes del trasplante, el suelo de la maceta experimental se trató con cuatro dosis de *P. lilacinum* PLSAU-1 y cinco niveles de inóculo de *M. incognita* después de tres días. Cuando el cultivo se infectó con 800 huevos de la plaga, los hallazgos revelaron que una dosis

de 1×10^6 UFC/g de suelo de *P. lilacinum* PLSAU-1 logró reducir el factor reproductivo de *M. incognita* hasta en un 81 por ciento. El estudio encontró que *P. lilacinum* PLSAU-1 es un agente biológico eficiente para controlar el nematodo agallador de la berenjena y puede ser un componente importante de una estrategia de manejo ecológicamente amigable.

Fatemy realizó un estudio en 2019 para evaluar el potencial de dos hongos antagonistas, la biofumigación, la enmienda del suelo y la solarización para el manejo de *M. javanica*. Se inocularon suspensiones de *Pochonia chlamydosporium* var. *chlamydosporium* y/o *Purpureocillium lilacinum* en macetas para proporcionar 1×10^4 y 2×10^6 esporas/g de suelo, respectivamente. Al infectar casi el 36% de los huevos frescos en las raíces, se demostró que ambos hongos son prometedores como agentes de control biológico, reduciendo la proliferación de nematodos y aumentando el peso de la planta de pepino. El crecimiento del pepino fue impulsado por todas las técnicas. Los hallazgos sugieren que los agentes de control biológico y los enfoques no químicos deben explorarse como parte de un plan integral de manejo de nematodos. (Fatemy, 2019)

En cuanto al estudio titulado *Pochonia chlamydosporia* aplicada mediante tratamiento de semillas para el control de nematodos en dos tipos de suelo, el objetivo fue determinar el efecto de la textura del suelo en el desarrollo de *P. chlamydosporia* utilizada como fertilizante de semillas para el control de *Meloidogyne incognita* en un invernadero de soja. Se llevó a cabo utilizando semillas de soja tratadas con *P. chlamydosporia* sembradas en tubos de PVC que contenían tierra arcillosa o arenosa infestada con huevos de *M. incognita*. Se descubrió que el hongo es capaz de filtrarse en el suelo hasta 50 cm de profundidad y es eficaz para controlar *M. incognita* tanto en suelos arenosos como arcillosos; sin embargo, el hongo mostró una mayor colonización y percolación en suelo arenoso, lo que puede explicar por qué es más eficaz para controlar el nematodo cuando se aplica en suelo arenoso. (Carvalho, y otros, 2018)

En 2017 se realizó una evaluación de *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum* para el control de *Meloidogyne enterolobii* en tomate y banano. Se utilizaron placas de cultivo de tejidos para probar la capacidad de las cepas de *Pochonia chlamydosporia* (var. *Catenulata* y *chlamydosporia*) y *Purpureocillium lilacinum* para infectar huevos del nematodo agallador *M. enterolobii* en superficies de agar agua. Cuando se administraron las mismas cepas a las masas de huevos, las cepas más eficientes redujeron la incubabilidad de J2 entre un 57 % y un 84 % en comparación con los huevos no tratados, mientras que las reducciones típicas fueron solo del 37 % al 55 %. El número de huevos se redujo en un 34% y un 44% en otro

experimento con plantas de tomate con *P. chlamydosporiavar. catenulata* o *P. lilacinum*, respectivamente, sin embargo, las cepas probadas fueron ineficaces a un nivel de infestación moderado. Finalmente, si se van a emplear los hongos *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* como métodos de control biológico para *M. entorolobii*, deben usarse en contextos agrícolas con bajos niveles de infestación del suelo y en conjunto con una estrategia de MIP. (Silva, et al., 2017)

Control de nematodos en Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) con el hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* en San Martín - Perú, de Sangama (2016), tuvo como objetivo determinar la mejor dosis y costo de aplicación del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* para el control de nematodos en Sacha Inchi. Se utilizó el enfoque al azar, con 5 bloques y 6 tratamientos, utilizando el Diseño de Bloques Completamente al Azar. Se utilizó *Pochonia chlamydosporia* multiplicada en concentraciones de arroz en dosis de 2 g, 4 g, 8 g y 16 g por litro de agua en cada planta, así como un control químico y un control absoluto. *Meloidogyne spp.*, *Aphelenchus spp.*, *Tylenchus spp.*, *Rotylenchulus spp.*, *Tylenchorhynchus spp.* y *Helicotylenchus spp.* fueron los nematodos más comunes detectados en función de su población. Los tratamientos T2, T3 y T4 se destacaron en el grupo de control, lo que indica un mejor control de *Meloidogyne spp.* y *Aphelenchus spp.*, respectivamente. Los tratamientos T4 y T3, que equivalen a 8g y 4g de esporas replicadas en arroz/litro de agua, se destacaron en altura de planta, área foliar y contenido de clorofila.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Caracterización del Problema

Varias enfermedades parasitarias afectan gravemente a la producción de café en todo el mundo. Tradicionalmente, el uso de pesticidas o medicamentos nematocidas químicos se considera el método más común para controlar dichos parásitos. Sin embargo, esto ha provocado un riesgo inminente para la salud pública debido a la exposición continua de las personas a esos productos químicos. Durante las últimas décadas, el uso de alternativas amigables con el medio ambiente ha sido ampliamente investigado en la búsqueda de productos animales o vegetales más saludables para el consumo humano.

Asimismo, el uso de microorganismos beneficiosos como agentes de control natural está ganando una muy buena reputación frente a los fármacos nematocidas químicos. Los hongos nematófagos son antagonistas de nematodos naturales que ofrecen muy buenas esperanzas para el control de nematodos parásitos de animales y plantas. Han mostrado un enorme potencial para controlar una serie de géneros/especies de nematodos parásitos de plantas de importancia económica. Numerosos estudios sobre el uso de *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* para el manejo de nematodos que afectan a varios cultivos han mostrado experiencias fascinantes en muchos países. En estos se ha demostrado que la infección de huevos ocurre en un 70% al 80% por una variedad de cepas de *P. chlamydosporia* o *P. lilacinum*. (Manzanilla-López & Lopez-Llorca, 2017)

Delimitación del Problema

Para Nicaragua, tanto económica como social y ambientalmente, el café (*Coffea Arabica L.*) es un producto relevante que representa alrededor del 25% de las exportaciones. Varios nematodos parásitos de las plantas están relacionados con la producción de café y causan daños importantes a los productores de café y a la economía local. En Centroamérica, los nematodos se encuentran comúnmente en la mayoría de las regiones cafetaleras, excepto en Honduras. (Matus & Jiménez-Martínez, 2020)

Como resultado del uso indiscriminado de químicos sin criterio por parte de los pequeños productores de café, que ha resultado en un aumento en el costo de producción del manejo de nematodos, así como la amenaza para la salud de los agricultores y el medio ambiente donde se cultiva, ha surgido una necesidad de investigar el control más económico y efectivo que se puede recomendar y difundir a todos los productores de café del país. Como

resultado, el uso de biocontrolador ofrecerá la mejor solución para la protección de nematodos, reduciendo así el uso de estos pesticidas químicos, proporcionando una mayor calidad de vida para los agricultores, así como mejores ingresos económicos y un producto beneficioso de mayor calidad, tanto para los productores como para los consumidores, lo que resulta en una agricultura más sostenible. Por tanto, se pretende evaluar a *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacium* como agentes de control biológico en nematodos fitopatógenos de cultivos de café.

Formulación del Problema

De lo anteriormente mencionado se plantea lo siguiente, ¿Podrían *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacium* ser utilizados como agentes de biocontrol en nematodos fitopatógenos de cultivos de café?

Sistematización del Problema

De lo cual se generan las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Qué géneros de nematodos fitopatógenos se encontrarán asociadas al cultivo de café?
2. ¿El producto Bioconsorcio Nematicida cumplirá con la calidad microbiológica necesaria para usarse como tratamiento?
3. ¿Cuál será la efectividad de los tratamientos de *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacium* como biocontroladores sobre nematodos fitopatógenos?
4. ¿Tendrá correlación la eficacia de los tratamientos de *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacium* como biocontroladores sobre nematodos fitopatógenos y las variables agronómicas de las plantas de estudio?

JUSTIFICACIÓN

Los nematodos fitopatógenos causan grandes pérdidas a la economía agrícola, debido a su alta adaptabilidad, reproducción, supervivencia y amplia gama de hospedadores como lo son los cultivos de café. En Nicaragua, El cultivo de café (*Coffea arabica*. L), constituye una de las actividades de mayor importancia económica; sus exportaciones generan divisas que consistentemente han conformado aproximadamente el 25 por ciento del valor total de las mismas (MAGFOR, CONACAFE, IICA, 2008). La producción de café está limitada por plagas y enfermedades tales como: Minador de la hoja del cafeton Broca del café, Roya, Mancha de hierro), Antracnosis y Nematodos: (*Meloidogyne spp*, *Pratylenchus spp*, *Rotylenchulus spp*, *Helicotylenchus spp*). Estos últimos constituyen una plaga de mucha importancia para el cultivo del café, ya que afectan principalmente el sistema radicular.

Generalmente, el control de nematodos se realiza mediante el uso de nematicidas fumigantes o no fumigantes quizás por su efectividad en la reducción de niveles poblacionales y su disponibilidad en el mercado. Sin embargo, la capacidad de detectar concentraciones de nematicidas en la atmósfera ha aumentado la vigilancia ambiental y ha aumentado la preocupación por su uso. Los nematicidas son altamente tóxicos cuya persistencia en los suelos suele prolongarse, siendo un grave problema para las aguas subterráneas, de igual forma su incidencia en intoxicaciones y mortalidad han llevado a la prohibición de estos en algunos países. Como alternativa al manejo químico de *Meloidogyne spp.*, Agentes de biocontrol como *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum* se consideran las más prometedoras en el manejo de poblaciones de nematodos.

Por tanto, se insta en la realización de esta investigación en el país para evaluar el potencial biocontrolador de *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* sobre nematodos fitopatógenos, desarrollando una técnica de control sin producir efectos nocivos para el ser humano, los animales y el ecosistema, suscitando el interés en desarrollar insumos comerciales seguros y económicos basados en estos hongos. Este estudio servirá como referente a la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua- Managua y al Instituto Politécnico de la Salud acerca de la temática de hongos nematicidas y brindará información a biólogos; microbiólogos; agrónomos y demás instituciones las cuales estén interesadas en el tema; simultáneamente servirá como indicio para la implementación de biocontroles y mejores prácticas agroecológicas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el uso los hongos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacium* como agentes de biocontrol en nematodos fitopatógenos de cultivo de café en invernadero, Managua, Nicaragua, junio-diciembre 2021.

Objetivos Específicos

1. Identificar mediante características morfológicas las poblaciones de nematodos fitopatógenos que se encuentran asociados al cultivo de café.
2. Verificar la calidad microbiológica de la formulación del producto Bioconsorcio Nematicida.
3. Determinar la efectividad de diferentes tratamientos de *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacium* como biocontroladores de nematodos fitopatógenos de cultivo de café en diferentes períodos de tiempo.
4. Estimar la correlación entre los niveles de eficacia de los tratamientos de *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacium* como biocontroladores de nematodos fitopatógenos y las variables agronómicas de las plantas de café en estudio.

HIPÓTESIS

La pregunta de investigación planteada sugiere la hipótesis de partida que se menciona a continuación:

H₀: Los tratamientos con *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* a evaluar en el control de nematodos fitopatógenos son estadísticamente igual al nivel del 5 % de significancia.

H_a: Al menos dos de los tratamientos con *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia*, difieren estadísticamente al nivel del 5 % de significancia en el control de nematodos fitopatógenos de cultivo de café.

CAPÍTULO II: Marco Teórico

Cultivo de Café

Varias naciones, entre ellas Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia, Etiopía, Costa Rica y Nicaragua, dependen en gran medida del café (*Coffea spp*). (Herrera, et al., 2011). La producción de café de Nicaragua es una de las actividades económicas más importantes del país. El café representa alrededor del 25% de las exportaciones de Nicaragua y es una de las fuentes de empleo más importantes, empleando hasta el 63% de todos los trabajadores rurales y aproximadamente el 13% de la fuerza laboral del país (Pérez, 2019). Varias variables limitantes, como los nematodos parásitos, las plagas de insectos y las enfermedades fúngicas, tienen un impacto en la producción de café (Castellón, 2014).

El cultivo del café en Nicaragua se inició en la zona del Pacífico, especialmente en el departamento de Carazo, antes de extenderse al centro y norte del país. Actualmente, los departamentos de Jinotega y Matagalpa tienen la mayor cantidad de tierra cultivada con café, seguidos de Nueva Segovia, Carazo y Managua (Matus & Jiménez-Martínez, 2020).

Caturra

La variedad Caturra es una mutación de la variedad Bourbon, que fue identificada en Brasil en el siglo veinte. Es una planta de crecimiento bajo con un eje principal grueso y entrenudos cortos; el ángulo de las ramas juveniles con el tallo principal es de 45 grados; su ramificación se distingue por tener entrenudos cortos y muchas ramas secundarias que le dan a la planta un aspecto compacto. Las hojas son grandes, lanceoladas y anchas, de color y textura verde oscuro, con márgenes ondulados y continuos; las hojas jóvenes (brotes) son de color verde claro brillante.

La forma de la Caturra es bastante angulosa, compacta y con mucha vegetación. Este tipo produce frutos rojos y amarillos, es el principal café nicaragüense que produce frutos rojos; produjo granos medianos, de alta producción, pudiendo alcanzar un promedio de 45 quintales por manzana en las mejores condiciones (64 quintales por hectárea). La fruta madura temprano y tiene una taza de gran calidad. Las plantaciones de caturra requieren un cuidado cultural suficiente, especialmente en lo que respecta a la nutrición. (ANACAFE, 2016)

Nematodos Fitopatógenos

Los nematodos son criaturas cilíndricas, lisos, no segmentados, con apariencia de gusano que miden menos de 1 a 2 mm de largo. Nematodos fitopatógenos se denominan así porque se alimentan de los nutrientes de las plantas. La mayoría de estos son parásitos de las raíces y algunos prefieren otras partes de la planta (tallos, hojas, flores y semillas) (Sarven, et al., 2019). Son las criaturas multicelulares más numerosas del planeta (7.000 millones por hectárea considerando una profundidad de 6 cm). Muchos de ellos viven como parásitos de las plantas en raíces, tallos, hojas, semillas, bulbos y rizomas.

Los adultos se pueden distinguir por la existencia de un sistema reproductivo. Los machos suelen ser más pequeños que las hembras en la mayoría de los animales, que tienen sexos separados. Las hembras tienen uno o dos ovarios, útero, vagina y vulva, y ocasionalmente una o dos espermatecas donde se guardan los espermatozoides. La existencia de un mecanismo copulador en la parte posterior del cuerpo distingue a los machos. Pasan por seis fases en su ciclo de vida: huevo, cuatro estadios juveniles y adulto. Las mudas son las transiciones entre las fases juvenil y adulta (Decraemer & Hunt, 2013).

Los nematodos son los organismos multicelulares más comunes del planeta y prosperan tanto en ambientes acuáticos como terrestres. Los nematodos depredadores, los parásitos de insectos y los parásitos de las plantas son todos tipos de nematodos bacterívoros, fungívoros, omnívoros y depredadores (fitoparásitos). Es esencial tener en cuenta que, si bien los "nematodos" a menudo se asocian con infecciones que causan enfermedades en los cultivos, no todos los nematodos del suelo son dañinos para la agricultura; de hecho, ciertos nematodos cumplen una función reguladora vital en los ciclos de nutrientes. Así como los nematodos entomopatógenos, que son agentes esenciales de control biológico de plagas y, por ser útiles desde el punto de vista agrícola, deben ser considerados al planificar e implementar técnicas de control nematológico en el campo.

Los nematodos parásitos de las plantas residen y migran a través de la capa acuosa del suelo, así como dentro de los tejidos vegetales, en un laberinto de microtúneles. Todos tienen un estilete oral o un arpón, que les permite alimentarse perforando la pared celular de la planta huésped. Se clasifican en los siguientes grupos en función de sus hábitos de alimentación y movilidad:

a) **Ectoparásitos.** A lo largo de su ciclo de vida, permanecen fuera de la raíz y se alimentan de las células epidérmicas o de las raíces más profundas. Tienen la capacidad de trasladarse a nuevas zonas de alimentación (por ejemplo, *Criconemoides*, *Longidorus*, *Trichodorus*, *Tylenchorhynchus*, *Xiphinema*).

b) **Endoparásitos migratorios.** A medida que se mueven, penetran en el sistema de raíces y se alimentan de las células de la raíz (por ejemplo, *Pratylenchus*).

c) **Endoparásitos sedentarios.** Entran en el sistema radicular, pierden su movilidad y retienen un sitio de alimentación activo a través de células radiculares muy cambiadas (por ejemplo, *Meloidogyne*, *Globodera*, *Heterodera*, *Tylenchulus*).

Los agricultores y técnicos agrícolas frecuentemente subestiman los efectos de los nematodos fitopatógenos en los cultivos debido a los síntomas inespecíficos que producen, que frecuentemente se confunden con trastornos nutricionales, estrés hídrico, problemas de fertilidad del suelo y otras infecciones secundarias causadas por hongos y bacterias, cuya entrada puede ser facilitado por la acción del nematodo. Sin embargo, estimaciones de varias fuentes muestran que los nematodos parásitos de las plantas disminuyen la productividad agrícola mundial entre un 12 y un 20%, lo que asciende a alrededor de \$ 100 mil millones por año (Mesa-Valle, et al., 2020). Esta estimación de pérdidas sería mayor si no se utilizaran métodos de control nematológico, ya que se utilizan con frecuencia después de medidas de control generales, como la limpieza del suelo, lo que implica una menor percepción de la gravedad y prevalencia de estas enfermedades entre los agricultores y técnicos agrícolas.

Nematodos Agalladores (Meloidogyne spp.)

Los nematodos formadores de nódulos de raíces se pueden encontrar en todo el mundo, pero son más comunes y abundantes en lugares con temperaturas cálidas y secas e inviernos cortos y suaves. Estos nematodos también se pueden encontrar en invernaderos que emplean suelo no esterilizado. Se dirigen a alrededor de 2.000 especies de plantas diferentes, incluida la mayoría de las plantas cultivadas. Los nematodos agalladores son miembros del género *Meloidogyne* (*Meloidogyne*=hembra con forma de manzana). (Orlando, et al., 2020).

Ciclo de Vida.

Se ha culpado a *Meloidogyne* por pérdidas de producción anuales de hasta un 30% en cultivos de hortalizas vulnerables. Tiene un efecto similar en las raíces de la planta huésped como signos de un sistema radicular defectuoso. Los rendimientos de las plantas y la calidad

del producto se reducen, se presentan déficits nutricionales, se atrofia el desarrollo de los brotes y se produce un marchitamiento transitorio incluso cuando la humedad del suelo es adecuada. Estos nematodos formaban vínculos muy particulares con sus huéspedes. Inyectan secreciones en las células vegetales con el estilete y extraen nutrientes de las células de la raíz infectada (Asamizu, et al., 2020). Las células de alimentación, también conocidas como células grandes, son la única fuente de alimento para el nematodo en crecimiento.

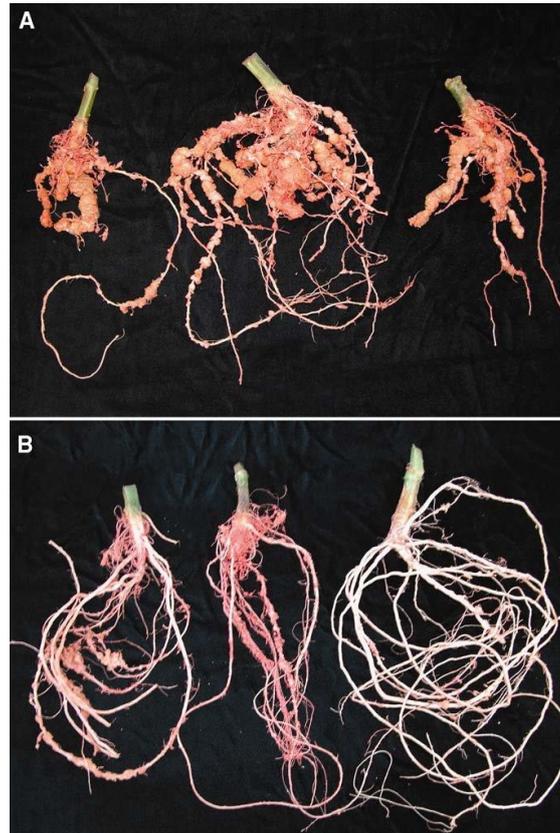
Se las conoce como células grandes porque provocan la creación de las agallas habituales en el sistema radicular, que es el síntoma aparente más destacado (Fatemy, 2019). Después de 24 a 48 horas, las células alrededor del juvenil en desarrollo continúan multiplicándose y expandiéndose, eventualmente formando agallas. La reproducción de *Meloidogyne* varía desde la reproducción sexual obligatoria (anfimixis) en unas pocas especies hasta la partenogénesis obligatoria (apomixis) en una fracción sustancial de especies partenogénicas facultativas (Silva, et al., 2017). En general, la partenogénesis se asocia con ciclos de vida más cortos y mayores tasas de reproducción.

Mayores impactos agronómicos están asociados con especies apomícticas. La proporción macho-hembra de las especies de nematodos agalladores varía aún más, ya que los machos generalmente están inhibidos en las especies partenogénicas. Los machos se descubren cuando las condiciones son desfavorables para el crecimiento de las hembras, como cuando los suministros de alimentos son escasos. La hembra en forma de pera produce huevos que se descargan en la superficie de la raíz irritada. Los huevos están encerrados en masas de huevos, que se componen de una matriz de glicoproteínas (Kumar, et al., 2020)

La masa del huevo es blanda y pegajosa al principio, pero a medida que envejece, se vuelve más dura y de color marrón más oscuro. La cantidad de huevos producidos por una sola hembra está determinada por factores ambientales. Si las circunstancias son favorables, la hembra puede poner de 500 a 2000 huevos (Sangama, 2016). La embriogénesis ocurre dentro del huevo, seguida de la primera muda al juvenil infeccioso de segunda etapa (J2). En el suelo, J2 penetra en la raíz del huésped y viaja entre las células y comienza a alimentarse. El J2 infeccioso se propagó a la raíz y estableció un sitio de alimentación persistente. El estilete es utilizado por juveniles de segunda etapa para causar la desdiferenciación de las células de la raíz en células grandes especializadas que alimentan la nutrición del nematodo. El nematodo se vuelve sedentario en esta etapa y muda a la tercera etapa juvenil (J3), la cuarta etapa juvenil (J4) y finalmente la etapa adulta (Mesa-Valle, et al., 2020).

Figura 1.

Agallas del nematodo agallador, *Meloidogyne spp.* en raíces de pepino. Thies, et al., 2004

**Morfología.**

Hembras. Las hembras de los nematodos sedentarios de los nudos de la raíz son de color blanco nacarado con un cuerpo redondeado a en forma de pera y un cuello que sobresale, ocasionalmente se dobla (Figura 2). No hay etapa de quiste. Las hembras tienen un rango de longitud de 350 μm a 3 mm y un rango de ancho máximo de 300 a 700 μm . La anulación de la cutícula sólo es evidente en las hembras adultas en el área de la cabeza y la porción posterior, donde se puede observar un patrón cuticular o patrón perineal distintivo alrededor del perineo (región vulva-año). La forma de este patrón se puede cambiar con frecuencia y se ve afectada por una variedad de variables de desarrollo. El perineo es terminal y los fásquidos se encuentran directamente encima del año.

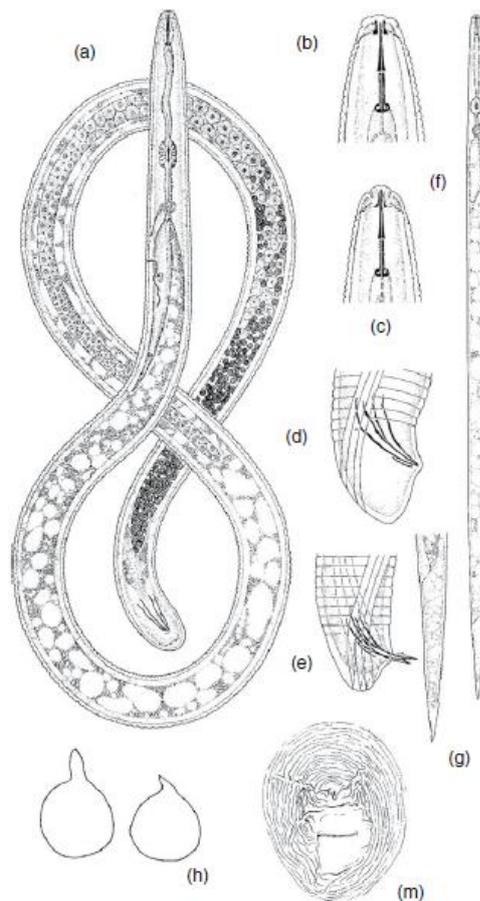
Machos. El macho no sedentario es vermiforme, prominentemente anulado y mide de 600 a 2500 μm de longitud (Figura 2). Un casquete y una región de la cabeza forman la cabeza. Las incisiones o anulaciones transversales pueden desplazar y / o dividir parcialmente la región de la cabeza. El casquete del cráneo generalmente está unido con cuatro labios mediales y tiene un disco labial ancho y redondeado. Cada labio medial tiene un sensillum cefálico y seis

sensillum labial interno centrados alrededor del orificio de la boca. Entre el disco labial y el labio lateral hay dos enormes aberturas anfidales en forma de hendidura. La estructura cefálica y el estilete recto están muy desarrollados, midiendo este último de 13 a 33 μm de longitud. El DGO está de 2 a 13 μm detrás de las tres perillas del estilete; la forma del botón del estilete es la misma que en las hembras.

Juvenil de segunda etapa. El J2 infeccioso es vermiforme, anulado y tiene una longitud de 250 a 600 μm (Figura 2). La anatomía de la cabeza es similar a la de los machos, aunque es algo más pequeña y tiene una estructura cefálica débilmente esclerotizada. El diminuto estilete recto mide entre 9 y 16 μm de longitud y el DGO se coloca entre 2 y 12 μm detrás de las perillas del estilete. La tercera y cuarta etapas juveniles son sedentarias e hinchadas dentro de la raíz; carecen de estilete y se desarrollan dentro de la cutícula J2. (Karssen, et al., 2013).

Figura 2

Meloidogyne (a) macho completo; (b,c) región labial masculina; (d,e) cola masculina; (f) juvenil infeccioso entero (J2); (g) cola J2; (h) hembras maduras. Hunt, et al., 2018



Nematodos de la Lesión de la Raíz (Pratylenchus spp.)

El nematodo de la lesión o de los prados se puede encontrar en todo el mundo y ataca las raíces de muchas plantas, como cultivos de campo, cereales, hortalizas, árboles frutales y muchas plantas decorativas. *Pratylenchus* es el género de *pratylenchid* más extendido en términos de la variedad de ambientes que habita. Si bien la mayoría de las especies de *Pratylenchus* tienen una relevancia económica insignificante o menor, algunas son responsables de pérdidas significativas de rendimiento en una variedad de cultivos agronómicos y hortícolas. *Pratylenchus spp.*, junto con los nematodos agalladores y quiste, son los nematodos que causan el mayor daño agrícola a nivel mundial.

El grado de daño causado por el nematodo lesionador varía según el cultivo atacado, y consiste en una disminución o inhibición de la raíz inducida por la creación de lesiones locales en las raíces jóvenes, que ocurren antes de que hongos y bacterias secundarios provoquen su aparición. Las plantas afectadas se desarrollan lentamente, producen pocos frutos y finalmente mueren como resultado del daño de las raíces. (Duncan & Moens, 2013).

Ciclo de Vida.

En la mayoría de los casos, la muda inicial ocurre dentro del huevo, cuando el juvenil de primera etapa (J1) se convierte en un juvenil de segunda etapa (J2). La etapa J2 permanece dentro del huevo hasta la eclosión, que ocurre alrededor de una semana después de la deposición del huevo. Después de la eclosión, el J2 muda a J3 y posteriormente a J4 entre 35 y 40 días, antes de mudar a adultos y convertirse en hembra o macho (Orlando, et al., 2020). Los machos son abundantes en ciertas especies (*P. coffeae* y *P. penetrans*) pero raros o inexistentes en otras (*P. crenatus*, *P. negligencias* y *P. thornei*), reproduciéndose esta última por partenogénesis. La reproducción anfimíctica ocurre cuando los machos están presentes. Las hembras depositan huevos, que se pueden encontrar en racimos dentro de las raíces, así como en el suelo circundante. (Sangama, 2016).

El ciclo de vida de los nematodos de las lesiones de las raíces en la naturaleza es poco conocido y prácticamente todos los datos disponibles provienen de experimentos realizados en entornos controlados. El tiempo que tarda un organismo en completar su ciclo de vida está determinado por la especie, la temperatura y la planta huésped. En el trébol rojo, por ejemplo, *P. penetrans* tiene un ciclo de vida de 54 a 65 días y cada hembra produce de 16 a 35 huevos a razón de 1 a 2 huevos por día, pero *P. thornei* tiene un ciclo de vida de alrededor de 25 a 35

días en discos de zanahoria. El tiempo del ciclo de vida puede ser determinado en parte por la temperatura. (Manzanilla-López & Lopez-Llorca, 2017).

Morfología.

Las especies de *Pratylenchus* son nematodos gruesos, de tamaño diminuto a mediano con longitudes corporales de menos de 0,9 mm que rara vez son significativamente móviles. El estilete y los labios están severamente esclerotizados. El área del labio es baja y aplanada en la parte anterior, con dos, tres o, a veces, cuatro anillos labiales, y no está (o solo ligeramente) desplazada del cuerpo. No hay dimorfismo sexual en la sección frontal del cuerpo y las glándulas faríngeas se superponen al intestino ventralmente en una distancia media. Las hembras son monoprodelíficas, con una rama genital anterior que puede incluir o no una espermateca madura y una rama posterior reducida a un saco postuterino. La cola del macho en las especies dominadas por machos es puntiaguda, con las alas caudales que llegan hasta la punta. El gubernaculum es liso y carece de protuberancia.

Cuando se examina con un microscopio óptico, *Pratylenchus* muestra poca variación morfológica interespecífica. Algunas características, como la forma de la cola, pueden variar mucho dentro de una especie. Esto hace que sea sencillo identificar a los miembros del género pero difícil de distinguir entre especies. (Duncan & Moens, 2013).

Nematodo Espiral (Helicotylenchus spp.)

Helicotylenchus es uno de los géneros más grandes entre los *tylenchs*, con más de 160 especies probables. Varios de ellos han sido identificados como endoparásitos. Esta distribuida mundialmente con una diversa gama de huéspedes. Muchas plantas lo tienen como ectoparásito o semi-endoparásito en sus raíces. Los nematodos quedan parcial o totalmente enterrados en la raíz, alimentándose durante varios días de una sola célula. Las raíces desarrollaron lesiones corticales como resultado de la alimentación. Es un importante parásito del banano que se encuentra en las regiones productoras de banano del mundo. Es un endoparásito que se alimenta de la corteza de las raíces y provoca pequeñas lesiones superficiales (Decraemer & Geraert, 2013).

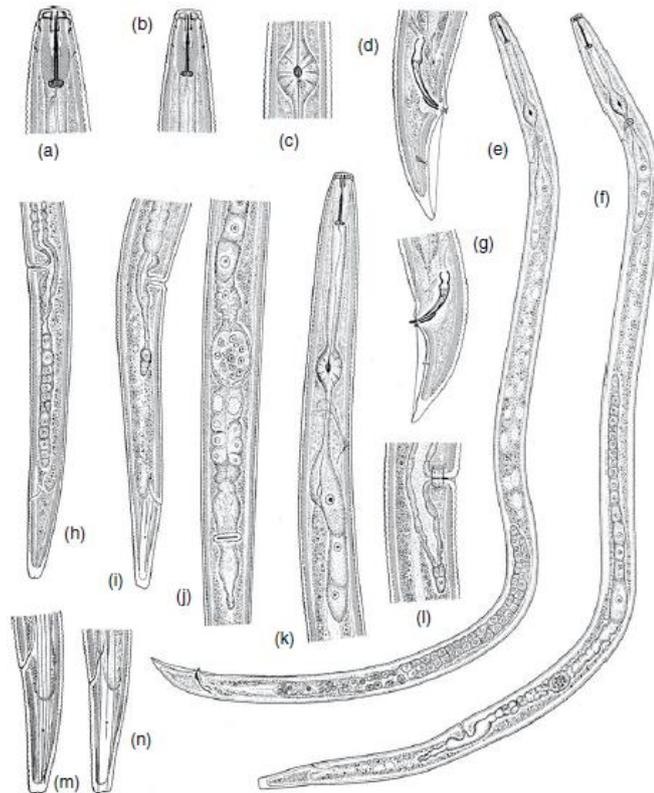
Ciclo de Vida.

Helicotylenchus spp. tienen un ciclo de vida de 26 a 34 días a 25°C. A esta temperatura, todos los estadios larvarios tuvieron un tiempo de desarrollo más corto: 9 a 12 días para la incubación del huevo y el primer estadio juvenil dentro de él, 8 a 10 días para el segundo

estadio juvenil (J2), 6 a 7 días para el estadio juvenil tres (J3), y solo de 3 a 5 días para el estadio juvenil cuatro (J4). El sistema reproductivo puede diferenciar la primera muda dentro del huevo, así como las tres fases juveniles (Guzmán-Piedrabita, 2011).

Figura 3

Pratylenchus (a) región labial femenina; (b) región labial masculina; (c) bulbo mediano; (dyg) cola masculina; (e) macho completo; (f) hembra entera; (hyi) región posterior femenina; (j) región vulvar femenina, vista ventral; (k) región faríngea; (l) región vulvar; (myn) colas femeninas. Siddiqi, 1976



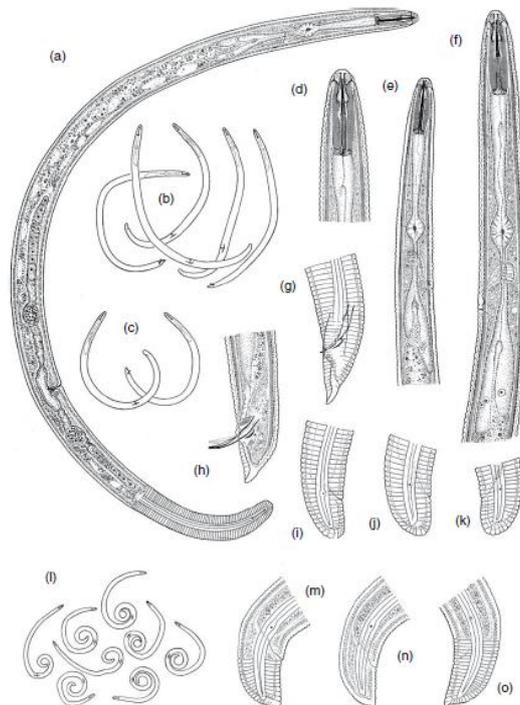
Morfología.

Hoplolaimidae: Hoplolaiminae. Enroscados en espiral o con poca frecuencia arqueados, de tamaño pequeño a mediano (0,4–1,2 mm). Un campo lateral de cuatro líneas. Cabeza redondeada o aplanada anteriormente, típicamente anulada pero casi nunca estriada longitudinalmente; anillo labial anterior no dividido en sectores. Marco cefálico bien desarrollado. Estilete robusto, aproximadamente de tres a cuatro veces la amplitud máxima de la región cefálica. A 6–16 μm del extremo del estilete se encuentra el orificio de la glándula faríngea dorsal. La bombilla del medio está redondeada. Las glándulas faríngeas se superponen al intestino en todos los lados, estando la luz faríngea entre la glándula dorsal y una de las glándulas subventrales, siendo la superposición lateroventral la más larga. Dos ramas genitales,

con la posterior degenerando ocasionalmente o reduciéndose a un saco uterino post-vulvar. Los epiptygmata están presentes, sin embargo, se pliegan hacia adentro en la vagina. Cola 1–2,5 diámetros del cuerpo anal de largo, más rizada dorsalmente, con o sin una proyección ventral terminal, a veces redondeada. Los machos pueden presentar poco dimorfismo sexual secundario en el extremo anterior más pequeño. Ala caudal alrededor del final de la cola. Los machos tienen una cola corta y cónica. Gubernaculum fijo con forma de artesa o varilla (Decraemer & Geraert, 2013).

Figura 4

Helicotylenchus (a) hembra entera; (b) mujeres; (c) hombres; (d) región labial femenina; (e) faringe femenina; (f) faringe masculina; (gyh) colas masculinas; (i – k) colas femeninas. *Helicotylenchus dihystra* (l) hembras; (m – o) colas femeninas. Siddiqi, 1972



Nematodo Reniforme (*Rotylenchus* spp.)

En su definición más amplia, el género *Rotylenchus* comprende 97 especies que pueden encontrarse en todos los continentes. En la agricultura, varias especies son económicamente importantes. *Rotylenchus robustus*, es la especie más extendida y común, habiendo sido documentada en 25 naciones e islas. Esta especie es la causa de una enfermedad devastadora que afecta a las zanahorias y la lechuga, lo que resulta en una pérdida significativa del tamaño de las raíces y un retraso en el desarrollo de la copa. Afectan a una o dos células en la superficie o, más comúnmente, a varias capas celulares profundas en la corteza. Produce lesiones y cavidades en tejidos epidérmicos y corticales (Decraemer & Geraert, 2013).

Ciclo de Vida.

Sin alimentarse, el nematodo reniforme progresa desde la etapa J2 recién eclosionada (segunda etapa juvenil) a través de cuatro mudas hasta la hembra inmadura en el suelo. Este procedimiento toma de 7 a 10 días a temperaturas que oscilan entre 25 y 30 grados centígrados. El único estadio infeccioso es la hembra juvenil vermiforme, que penetra la corteza de las raíces con el tercio anterior de su cuerpo, la parte posterior del cual entra en contacto con el suelo, y que eventualmente se expande, albergando los huevos y adquiriendo forma de riñón. El gusano genera sincitios multinucleados, que son células más grandes que sirven como lugar de alimentación permanente del nematodo. La reproducción ocurre cuando los machos, que son vermiformes y parecen desarrollarse sin alimentarse, fertilizan a la hembra en crecimiento. Cada masa de huevos contiene entre 50 y 100 huevos y se coloca en una matriz gelatinosa que rodea el cuerpo de la hembra. Durante una temporada de crecimiento, el gusano puede completar muchas generaciones, y el número de la población en la madurez del cultivo suele superar los 10 000 nematodos por 500 cm³ de suelo. Para el diagnóstico, se deben investigar muestras de suelo y raíces. Todas las etapas de la vida pueden eliminarse del suelo contaminado, excepto las hembras maduras e hinchadas. La anhidrobiosis permite que estos nematodos vivan durante meses en suelos muy secos, y los cuerpos de estas formas latentes comúnmente asumen orientaciones fuertemente enrolladas en suelos secos. (Bridge & Starr, 2019).

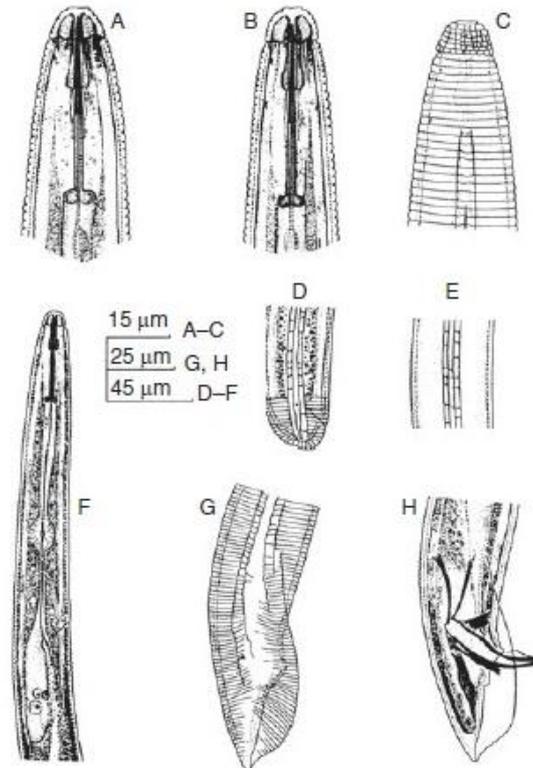
Morfología.

Hoplolaimidae: Hoplolaiminae. Ectoparásitos que suelen ser bastante grandes (1–2 mm), con un cuerpo en forma de espiral en forma de C. Campo lateral de cuatro líneas con o sin estrías transversales dispersas. Desplazamiento de la cabeza o continuo con los contornos del cuerpo, anteriormente redondeado o aplanado, típicamente anulado, con o sin estrías longitudinales en el anillo basal del labio. La estructura labial está muy esclerotizada y el estilete y los bulbos del estilete están bien formados, con superficies anteriores redondeadas a dentadas en los bulbos del estilete. La abertura de la glándula faríngea dorsal suele estar cerca del extremo del estilete (6 µm), aunque a veces puede ser más posterior (hasta 16 µm). El bulbo medial está bien desarrollado; las glándulas faríngeas cubren el intestino dorsal y lateralmente; la glándula dorsal está más desarrollada que las glándulas subventrales. Dos ramas genitales extendidas, igualmente formadas; la rama posterior rara vez degenera. Hay uno o dos epiptygmata presentes. La cola es corta y hemisférica, con una pequeña extensión ventral en

raras ocasiones. Los fásmidos son organismos diminutos en forma de poros que se encuentran alrededor del nivel del ano. Los machos tienen alas caudales que rodean la cola y no son lobuladas. Las espículas son fuertes y con rebordes (Decraemer & Geraert, 2013).

Figura 5

Rotylenchus. A y C, cabeceras femeninas; B, cabecera macho; D, extremo de la cola de la hembra; E, campo lateral femenino en la mitad del cuerpo; F, región faríngea femenina; G y H, extremos de la cola masculinos. Siddiqi, 1972, cortesía de CABI.



Nematodo Daga (*Xiphinema spp.*)

Todos ellos son pequeñas plagas de las plantas agrícolas que también intervienen en la transmisión de virus vegetales. Son ectoparásitos que viven en las raíces de plantas perennes y leñosas y se encuentran en todo el mundo. El nematodo daga tiene un impacto económico significativo en la uva, la fresa, el lúpulo y una variedad de cultivos que incluyen nectarina, roble, rosa, café, frambuesa, zanahoria, cereza, melocotón, plantas leñosas, árboles frutales, soja, maíz y algunos cereales. Existen alrededor de 163 especies de *Xiphinema*, las más importantes de las cuales son *X. americanum*, *X. diversicaudatum*, *X. index*, *X. italiae* y *X. pachtaicum*. Tienen un ciclo de vida muy largo, que va desde varios meses hasta dos años. Los nematodos generan necrosis y "células gigantes"; las células gigantes se deben a la cariocinesis sin la citocinesis resultando células multinucleadas. Debido a su gran longitud corporal y al

estilete largo que llega hasta el tejido vascular, se pueden reconocer fácilmente. (Decraemer & Geraert, 2013).

Ciclo de Vida.

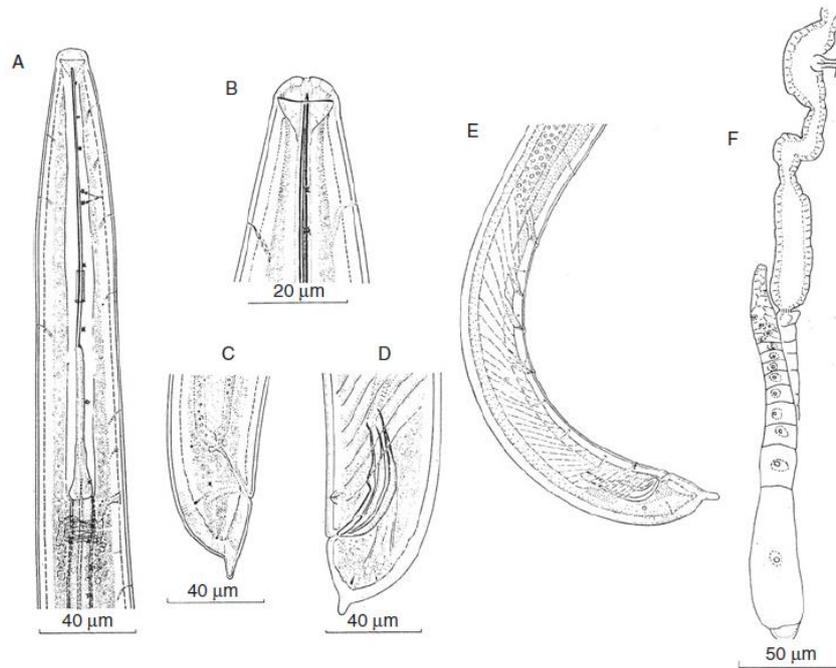
Los nematodos fitopatógenos del género *Xiphinema* tienen el mayor tamaño entre los nematodos fitopatógenos. La hembra madura puede llegar a medir 5 mm de largo. Los machos son poco comunes en la mayoría de las especies y no participan en la reproducción partenogenética. Dependiendo del clima, la hembra puede poner de uno a cien huevos. Antes de convertirse en adultos, los juveniles pasan por cuatro fases de desarrollo, y el desprendimiento inicial de la cutícula ocurre más allá del rango informado en el género *Meloidogyne*. Según la ubicación y la época del año, estos procesos pueden tardar varios meses en completarse. En algunas especies de *Xiphinema*, como *X. franci*, solo hay tres fases o estadios juveniles. Según el huésped, la ubicación geográfica del huevo, distinto de la tierra en la que se encuentran, el cambio de temperatura y la textura del suelo, el ciclo de vida de estos nematodos puede durar entre un mes y un año. A 24 °C en California, el ciclo de vida completo de estos nematodos, de huevo a adulto, toma de 22 a 27 días (Castro & Moreira, 2020). Según esta fuente, el tiempo que se tarda en completar una generación en Israel puede oscilar entre 7 y 9 meses a temperaturas entre 20 y 25 grados centígrados, o de 3 a 5 meses a 28 grados centígrados.

Morfología.

Nematodos delgados de 1,3 a 5 mm de largo La región labial puede ser continua o desplazada. Apertura anfidial: una hendidura ancha conduce a una bolsa en forma de embudo. Un odontostilo en forma de aguja con una base bifurcada conectada a un odontóforo con tres rebordes basales prominentes hace que este estilete sea extremadamente largo (60-250 µm). La guía del estilete parece tubular, con el 'anillo guía' colocado en la mitad posterior del odontostilo. Un procorpus largo y delgado y un pequeño bulbo glandular comprenden la faringe. Hembra: la vulva generalmente se coloca alrededor del 40-50% de la longitud del cuerpo, sin embargo, puede ser más anterior. Por lo general, el tracto anterior no es funcional, pero está disminuida en diferentes grados o incluso completamente ausente en ciertas especies, dos genitales presentes, en cuyo caso la vulva es mucho más anteriormente en alrededor del 25% de la longitud del cuerpo. La cola es bastante variada, de corta a larga y filiforme redondeada. Macho: espículas extremadamente fuertes, arqueadas. (Decraemer & Geraert, 2013).

Figura 6

Xiphinema. A, región faríngea; B, región de la cabeza, vista de la superficie; C, cola femenina; D, región de la cola masculina y aparato copulador; E, región posterior del cuerpo masculino; F, aparato reproductor femenino, rama posterior. Siddiqi, 1974

***Tylenchus spp.***

Este género se suele encontrar en la mayoría de los suelos. Se alimentan de algas, musgos, líquenes y raíces de plantas. Por ejemplo, en la República Checa de 1988 a 1991, se examinaron los nematodos del suelo en tres bosques de abetos. Hubo un total de 74 especies, la mayoría de ellas de *Tylenchida*, *Rhabditida* y *Dorylaimida*. Las plantas micofitófagas del grupo *Tylenchidae*, seguidas de los bacteriófagos, fueron los nematodos más comunes, particularmente los del orden *Rhabditida*. El declive lento de las plantas se refiere a la desnutrición gradual y la subsiguiente degradación del árbol causada por este tipo de nematodos. Muchos de estos nematodos pueden ser tolerados por los árboles maduros antes de que disminuya su vigor y aparezcan los síntomas. (Becker & Westerdahl, 2018).

Ciclo de Vida.

Presenta una fase de huevo, cuatro fases juveniles y una etapa adulta a lo largo de su ciclo de vida. Dentro del huevo del que emerge el juvenil de segunda etapa (J2), se desarrollan los juveniles de primera y segunda etapa (J1). Aproximadamente una cuarta parte de los J2 se convierten en machos que no se alimentan. A lo largo de su crecimiento, se mantienen largas y delgadas y no penetran en las raíces. Durante 2 a 3 semanas, el otro J2 se alimenta del exterior

de las raíces alimentadoras inmaduras. Luego hacen un túnel profundo en la corteza de la raíz, dejando expuesto el extremo posterior de esta. Considerando su abundancia en la rizósfera, solo un pequeño porcentaje de J2 llega a la raíz (zona radicular). Las hembras juveniles penetran más después de dos mudas. Con la ayuda de numerosas células nodrizas, establecen un sitio de alimentación. El extremo posterior de la hembra ahora sedentaria (estacionaria) se expande y se extiende desde la superficie de la raíz durante la madurez. Mientras tanto, su cabeza todavía está dentro de las células nodrizas de la raíz.

La reproducción sexual y asexual son posibles. Cada hembra puede poner alrededor de 100 huevos, que están protegidos por una matriz gelatinosa. De huevo a huevo, el ciclo de vida de la hembra dura de cuatro a ocho semanas. Después de los brotes de raíces de plantas, el número máximo de nematodos se detecta a menudo a fines de la primavera y el otoño. Las temperaturas entre 20 °C y 30 °C son ideales para incubar, alimentarse, crecer y reproducirse. Los juveniles de segunda etapa son la etapa más persistente, capaces de sobrevivir en suelo agrícola durante un año o más. (Becker & Westerdahl, 2018).

Morfología.

Anulación cuticular distinta, cuerpo femenino ventralmente curvado, en forma de C. El margen exterior del campo lateral está crestado. Con 4-5 anillos, la cabeza pasa de continua a descentrada. La longitud del estilete es de 14-19 µm. La distancia entre la vulva y el ano es mayor que la longitud de la cola. Espermateca ovalada, de 2'3 µm de diámetro, vacía o cargada de espermatozoides. El terminus de la cola es puntiagudo. Los machos tienen una estructura más delgada que las hembras. Estilete en duración de 16 a 19 h. La bursa está muy desarrollada, crenada y la longitud de la espícula es de 20'30 µm. (Ciobanu, et al., 2003).

Manejo de Nematodos Fitopatógenos

Según Sangama (2016), la erradicación total de los nematodos es casi imposible debido a una variedad de factores (amplia distribución en el suelo, características morfológicas, especies polífagas, ciclo de vida, etc.), por lo que todas las recomendaciones están dirigidas a prevenir una posible infestación y propagación de estos patógenos en varios cultivos:

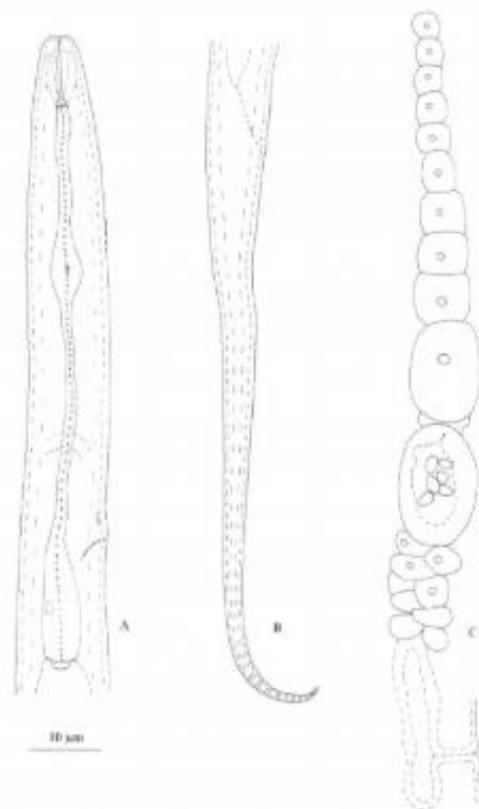
Control Químico

Carbofuran (Furadán), Fenamiphos (Nemacur), Oxamil (carbamato), Terbufos (organofosfato), Ethoprophos 9 (organofosfato), Dazomet (Basamid), Azadiractina y bromuro de metilo (BM) se encuentran entre los compuestos activos mencionados por varios escritores.

Estos causan daño ambiental debido a un uso inadecuado también son muy costosos (Collange, et al., 2011).

Figura 7

Tylenchus: A, parte anterior de la hembra; B, parte posterior de la hembra; X, aparato reproductor femenino. Ciobanu, et al., 2003



Impacto de los Antihelmínticos en el Ambiente.

La contaminación de las aguas subterráneas es uno de los problemas ambientales más graves relacionados con el uso de nematicidas. De hecho, hace más de 20 años, el descubrimiento de los nematicidas DBCP y aldicarb en el agua subterránea en los Estados Unidos provocó un aumento en el interés científico y regulatorio en la contaminación del agua subterránea con pesticidas que continúa hasta el día de hoy (Chitwood, 2003). La contaminación de las aguas subterráneas persiste a pesar de que el uso de DBCP fue prohibido en 1977. Debido a las preocupaciones sobre la contaminación de las aguas subterráneas, el fabricante de Temik (aldicarb) suspendió voluntariamente su distribución para su uso en patatas en 1990. Cuando finalizó la revisión especial de 1,3-D de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, se implementaron varias medidas para reducir la posible contaminación del agua subterránea, incluida una prohibición de uso dentro de los 100 pies de los pozos de

agua potable, en áreas sobre la geología kárstica y en varios estados con ciertos tipos de suelo y agua subterránea a 50 pies de la superficie del suelo (Pavone, 2012).

Como se indicó anteriormente, el uso de 1,3-D se detuvo temporalmente en California en 1990 debido a su descubrimiento en el aire lejos de los lugares de aplicación, especialmente en una escuela. Como resultado, se han establecido zonas de amortiguamiento de fumigación de 300 pies de ancho alrededor de las viviendas (100 pies de ancho si los campos se riegan por goteo). Además, en California, las "limitaciones de los municipios" limitan la cantidad total de 1,3-D que puede utilizarse en una determinada región (Carpenter, et al., 2001).

Control Cultural

Implica el manejo de varias opciones, incluido el uso de cultivos trampa, en particular para los nematodos agalladores de cultivos de ciclo corto; la solarización del suelo, que desinfecta y suprime eficazmente la mayoría de las especies de nematodos patógenos; y barbechos limpios de malezas hospedadoras, así como la rotación con cultivos no hospederos, que son todas medidas efectivas de control nematológico en muchos casos (Carvalho, et al., 2018).

Control Físico

Los nematodos parásitos de las plantas pueden destruirse fácilmente en el laboratorio mediante el uso de calor, irradiación, presión osmótica y otros métodos. Sin embargo, es más difícil aplicar tales procedimientos a áreas amplias de tierra, especialmente si están bajo cultivo. (Kumar, et al., 2020).

Control Biológico

Utilizando microorganismos naturales o diseñados para minimizar el impacto de organismos nocivos mientras se promueve el crecimiento de organismos útiles para humanos, plantas y microorganismos benéficos. Para lograr el control biológico, microorganismos nematófagos como la bacteria *Pasteuria penetrans*, el hongo *Purpureocillium lilacinum*, *Pochonia chlamydosporia*, *Hirsutella rhossiliensis*, *Catenaria spp.* *Arthrobotrys*, *Monacrosporium*; así como la aplicación de microorganismos de protección biológica que evitan que los nematodos penetren, se desarrollen y se reproduzcan en las raíces, como los hongos micorrízicos arbusculares o bacterias inductoras de resistencia sistémica como *Bacillus*, *Pseudomonas* y otras (Silva, et al., 2017).

Hongos Biocontroladores

Los agentes de biocontrol microbiano (BCA) para las enfermedades de las plantas son generalmente cepas fúngicas o bacterianas aisladas de la filosfera, la endosfera o la rizosfera, y desempeñan un papel crucial en el manejo de organismos patógenos de plantas. Los productos químicos de control biológico o los antagonistas microbianos impiden que el patógeno infecte la planta huésped o se establezca en la planta huésped. Se cree que los mecanismos de control que actúan principalmente sobre los patógenos son los más importantes. Los hongos antagonistas, entomopatógenos, micorrícicos y nematófagos pueden tener una variedad de métodos de acción directos e indirectos que ayudan a regular las enfermedades biológicas.

Estos mecanismos incluyen la antibiosis (en la que el antagonista produce un metabolito inhibidor o antibiótico), el micoparasitismo (en el que el antagonista obtiene algunos o todos sus nutrientes del hongo huésped), la resistencia inducida (inducción de la respuesta de defensa de la planta contra los patógenos de la planta) y mejora del crecimiento (los BCA promueven el crecimiento de las plantas mientras se reducen los efectos de la enfermedad y también a través de hormonas microbianas como el ácido indolacético y el ácido giberélico). Otras acciones involucradas en el manejo biológico de enfermedades con hongos incluyen la secreción de enzimas hidrolíticas extracelulares por parte del antagonista, la competencia por el espacio y la nutrición entre organismos y la desintoxicación del factor de virulencia. (Bendezu, 2017).

Hongos Nematófagos

En los últimos años, una estrategia alternativa al uso de nematicidas ha sido el control biológico, que implica el uso de microorganismos como bacterias, virus, nematodos saprobióticos y especialmente hongos nematófagos, los cuales han sido identificados como agentes de control biológico (BCA) debido a su capacidad para reducir las poblaciones de nematodos fitopatógenos a niveles mínimos de forma natural (Pérez, 2019). Como estrategias de biogestión para el control de nematodos, *P. chlamydosporia*. y *P. lilacinum* son de los microorganismos principales. Deben incorporarse al suelo sobre la base de un conocimiento profundo de la biología del hongo y la selección cuidadosa y combinación del biotipo aislado del hongo con cultivares seleccionados de plantas hospedantes que son menos susceptibles o resistentes al nematodo (Fatemy, 2019).

Pochonia chlamydosporia.

El hongo *Pochonia chlamydosporia* es un *Deuteromycete*, un parásito facultativo que aparece como parte de un complejo de diferentes especies relacionadas, parasitando quistes, huevos o nematodos de vida libre y se reconoce como un taxón amplio y heterogéneo, agrupado según caracteres relativamente simples y hasta ahora no está bien definido; esta especie y sus variedades producen más clamidosporas (estructura multicelular de paredes gruesas que descansa sobre un tallo en micelio aéreo o agar sumergido) que otras especies de *Pochonia*. Las conidias se producen en fialidas simples con esporas o dicticlamidosporas. La apresoría de hifas diferenciadas permite la colonización de la superficie del huevo, pero la penetración es el resultado de la presión física y la actividad enzimática (subtilasa) designada como VCP1 se ha caracterizado parcialmente y las pruebas in vitro demostraron eliminar la membrana más externa del huevo (Sangama, 2016).

Morfología.

En agar, las colonias de *Pochonia* son de color blanco a blanquecino a amarillo ocre y algodonosas. Es un hongo de crecimiento bastante lento, que crece a una velocidad de hasta 0,3 cm por día dependiendo de la temperatura de incubación. Los conidióforos pueden estar postrados y apenas se distinguen de las hifas vegetativas, o pueden ser erguidos y distintos, verticilados o solitarios. Los conidios se adhieren para producir cabezas o cadenas de esporas mucoides globosas. Las clamidosporas (dictyochlamydosporas) varían en forma y se desarrollan en tallos cortos o son menos distintas y carecen de tallo. Las clamidosporas suelen denominarse estructura de reposo del hongo; sin embargo, la palabra dictyochlamydosporas es más correcta. Se sabe que solo la fase sexual del hongo que se encuentra en los huevos de moluscos y produce peritecios (ascomas ostiolados subglobosos o con forma de matraz) (Manzanilla-López & Lopez-Llorca, 2017).

Mecanismos de Acción Nematicida.

Avelar et al. (2017) descubrieron que *P. chlamydosporia* forma una red de micelio en estrecho contacto con las masas gelatinosas (ootecas), produciendo penetración desde los huevos a través de apresorios desarrollados al final de largas hifas o ramas laterales, donde se desarrollan tubos de penetración extremadamente finos y cortos, que se ensanchan inmediatamente después de penetrar la cutícula de los huevos.

La adhesión, penetración y colonización son todos los eventos involucrados en el parasitismo de *Pochonia*:

- a) **Adherencia:** La adhesión es una fase clave en el proceso de infección porque permite que el hongo obtenga apoyo para el parasitismo y, en última instancia, la supervivencia. *Pochonia* genera glicoproteínas, que son responsables de la unión de conidios e hifas a los huevos (Carvalho, et al., 2018).
- b) **Penetración:** *Pochonia* genera apresorios y secreta enzimas extracelulares para ayudar en la penetración del huésped, una técnica compartida por entomopatógenos y hongos patógenos de plantas. Se desconocen los mecanismos que gobiernan la potencia mecánica empleada por el appressorium de *Pochonia* para perforar la cáscara del huevo, aunque la producción de enzimas juega un papel crítico en eludir la membrana de la yema y exponer la capa de quitina. (Silva, et al., 2017).
- c) **Colonización:** El hongo coloniza los tejidos del huésped después de penetrarlos para recolectar nutrientes. Su capacidad reproductiva aumenta una vez que están dentro. Los azúcares del huevo sirven como fuente de carbono para *Pochonia chlamydosporia*. Tanto los huevos como los embriones, así como el J2 dentro de los huevos, están colonizados por *Pochonia chlamydosporia*. Las hembras también son parasitadas por el hongo, que coloniza las células de alimentación especializadas de nematodos endoparásitos sedentarios que recolectan recursos vegetales. (Manzanilla-López & Lopez-Llorca, 2017).

Acción Enzimática: La mayor parte del conocimiento sobre el metabolismo de los hongos en la interacción de *P. chlamydosporia* y nematodos se refiere a VCP1, una enzima particular que degrada las proteínas exteriores de la cáscara del huevo. Los suministros de C de metabolización rápida, como la glucosa o, durante unas pocas horas, el cloruro de amonio, así como el pH ácido desfavorable en la rizosfera o la masa de huevos, parecieron alterar los niveles de parasitismo de los nematodos al alterar la síntesis de VCP1 (Manzanilla-López & Lopez-Llorca, 2017). La expresión de VCP1 es una etapa única en una complicada cascada bioquímica de mecanismos de inducción y activación génica que aún no se conoce por completo.

P. chlamydosporia secreta enzimas extracelulares que son importantes durante todo el proceso de infección del huevo, según varios estudios. Durante la infección por nematodos, *Pochonia spp.* las proteasas y las quitinasas pueden destruir componentes críticos de la cáscara

del huevo y, por lo tanto, son posibles factores de virulencia. Cuando coloniza endofíticamente raíces de cebada, *P. chlamydosporia* secreta la serina proteasa VCP1 y una serina carboxipeptidasa (SCP1) recientemente descubierta. En huevos de *M. javanica* afectados por el hongo, VCP1 y SCP1 también se han clonado, descrito e inmunolocalizado. (Kumar, et al., 2020).

Purpureocillium lilacinum.

Purpureocillium lilacinum (Thom) Samson, anteriormente *Paecilomyces lilacinus*, es un hongo natural del suelo. El efecto antagónico de este organismo sobre los huevos y las hembras de los nematodos parásitos de las plantas (NPP) ha despertado la curiosidad de los científicos (Vinces, 2019). Es un hongo que se puede encontrar en la mayoría de los suelos, aunque es más común en suelos tropicales y subtropicales. Este microorganismo es conocido por ser un poderoso controlador biológico que parasita una variedad de nematodos que son plagas agrícolas. Entre ellos destacan *Meloidogyne*, *Radopholus*, *Pratylenchus* *Heterodera* y *Globodera*. Aunque este hongo es más activo contra los huevos de nematodos, se ha observado que parasita tanto a las hembras móviles como estacionarias. Como resultado, este hongo se está desarrollando comercialmente como agente de control de plagas (Bendezu, 2017).

Morfología.

Las colonias de *Purpureocillium lilacinum* tienen una alta tasa de reproducción debido a su talo unicelular, micelio completamente formado, falta de flagelos y centríolos y reproducción sexual por gemación. Los conidióforos del género *Purpureocillium* son erguidos, de 400 a 600 micrones de largo, ramificados, agrupados o irregulares. Los conidióforos tienen una pared de textura rugosa, miden de 3 a 4 micrones de ancho y son de color amarillo a púrpura. Sus fiálides son grandes en la base y se estrechan hacia un cuello estrecho a medida que envejecen. Los conidios son elipsoidales a fusiformes con una pared lisa o ligeramente rugosa, hialina púrpura en la tercera masa, de 2.5 a 3 x 2 a 2.2 micrones de tamaño, y ocurren en cadenas divergentes (Vinces, 2019).

Colonias en agar papa dextrosa (PDA) con borde irregular y desarrollo lento y restringido, alcanzando un diámetro de 2,05, 2,5 a 3 cm en 7 días a 25 °C. Colonias redondas con bordes blancas algodonosas con centro elevado o colonias con superficie esponjosa, aterciopeladas, de colores purpuras (pupura grisáceo, pupura claro y pupura oscuro) y lila, el reverso de la colonia puede ser incoloro con 12 tonos de color amarillo, no presenta exudación, algunas especies también pueden presentar exudaciones de color amarillo brillante,

conidióforos septados con paredes lisas y ramificados en sus extremos triverticilados o cuadriverticulados, con metul, esto da lugar a conidios lisos o equinulados, elipsoidales de 2,5-3,5 μm , formando cadenas sin ramificar, con un característico aspecto de cepillo. (Ahmad, et al., 2019).

Mecanismos de Acción Nematicida.

Se ha demostrado que *P. lilacinum* penetra directamente en todas las etapas del nematodo después de la formación del apresorio, según Dahlin et al. (2019). El principal mecanismo de acción está asociado al ataque en estadios sedentarios, particularmente a los huevos de nematodos enquistados o sedentarios, produciendo leucinotoxinas, quitinasas, proteasas y ácido acético, compuestos directamente relacionados con el proceso de infección. *P. lilacinum* produce un apresorio para adherirse a la superficie del huésped y lograr la penetración después de la unión. Esta estructura secreta enzimas que destruyen los sustratos cercanos, creando un sitio de infección mucho más pequeño y permitiendo la penetración del huésped. (Moreno-Gavira, et al., 2020).

En concentraciones superiores a 10^7 UFC/ ml, el hongo *P. lilacinum* produce hifas sobre huevos y larvas en *Meloidogyne*, *Pratylenchus* y *Radopholus*, causando anomalías embrionarias. Las hifas se extienden por todo el huevo, mientras que las puntas se expanden y distorsionan. Una clavija de penetración se desarrolla desde la base de la hifa (aspensorio) hacia el huevo (Sarven, et al., 2019). Los huevos se expanden y se comban. A medida que avanza la penetración, los huevos se rompen y las hifas llenan completamente el huevo. El hongo luego emerge del huevo, provocando el primer desarrollo vegetativo. Después de 5 días, la mayoría de los huevos se han infectado. Los juveniles infectados mueren rápidamente.

P. lilacinum se aplana contra la superficie del huevo y se adhiere fuertemente antes de infectar un huevo de nematodo. Después de que se desarrollen algunas hifas a lo largo de la superficie del huevo, o después de que se forme una red de hifas en el huevo, *P. lilacinum* genera apresorios simples en cualquier parte de la cáscara del nematodo. La apresoría parece indicar que el huevo está contaminado o que se va a infectar. El apresorio aparece igual en ambos casos, como una simple hinchazón al final de una hifa, fuertemente adherida a la superficie (Vinces, 2019). La adherencia entre el apresorio y la superficie del huevo del nematodo debe ser lo suficientemente fuerte para resistir la fuerza opuesta creada por la punta expansiva de una hifa de penetración. Cuando la hifa penetra en el huevo, mata rápidamente al

juvenil que está dentro antes de expandirse fuera de la cáscara del huevo ahora vacía para generar conidióforos y extenderse a los huevos vecinos. (Fatemy, 2019).

Acción Enzimática: *P. lilacinum* produce enzimas que se sabe que tienen acción biológica contra los huevos del nematodo *Meloidogyne*, como las serinas proteasas. Se informa que *P. lilacinum* genera proteasa y quitinasa, enzimas que pueden dañar la cáscara del huevo (Ahmad, et al., 2019). Como resultado, existe un gran apoyo para las características biológicas de *P. lilacinum* como uno de los mohos para regular los huevos de lombrices.

Las enzimas proteasa y quitinasa extracelulares se encuentran en *P. lilacinum*. La quitina, que contiene monopolisacáridos, es un componente estructural sólido resistente a la presión. La proteasa se descompondrá y eliminará la capa de lipoproteínas del huevo, seguida de la hidrólisis de la quitinasa. Las enzimas quitinasa degradan la quitina formada a través del sistema quitinolítico de manera sinérgica, lo que da como resultado grandes vacuolas, roturas de la capa de vitelina y pérdida de integridad / densidad, y daño a la estructura del huevo. (Ahmad, et al., 2019).

CAPÍTULO III: Diseño Metodológico

Diseño Metodológico

Tipo de Estudio

El estudio fue experimental de carácter prospectivo con un enfoque cuantitativo. Tomándose muestras de suelo y raíces de las plántulas del invernadero de Biotechnica S.A. (fase campo) para luego ser trasladadas a su laboratorio, donde se realizó la evaluación del uso de hongos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacium* como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos en cultivos de café en invernaderos determinando la presencia y distribución de géneros de nematodos en un periodo de tiempo determinado (fase laboratorio), siguiendo un diseño experimental de Bloques Completos al Azar (BCA).

Área de Estudio

Los ensayos se realizaron en los laboratorios e invernaderos de BIOTECHNICA S.A ubicado de los semáforos del Club Terraza 5.3 km al sur en el municipio de Managua, Nicaragua. Las maceteras utilizadas en el estudio estuvieron rellenas con suelo y semillas proveniente de las fincas cafetaleras Santa María de Ostuma y Hacienda San Luis, localizadas en la Comarca de Molino Norte, municipio de Matagalpa, departamento de Matagalpa, Nicaragua. Con una ubicación geográfica de 12°59'15.6"N 85°54'00.5"W a 4.3 km al norte de la ciudad de Matagalpa.

Universo

El universo estuvo compuesto por la totalidad de plantas del almacigo de BIOTECHNICA S.A correspondientes a 480 plántulas.

Muestra

La muestra estuvo comprendida por 70 plántulas del invernadero de cada uno de los tratamientos en diferentes muestreos. La carta técnica de cómo manejar los almácigos, el suelo, las semillas, fueron provenientes de Santa María de Ostuma y San Luis, fincas cafetaleras de referencia. Las variedades corresponden a Caturra, los cuales se dividieron en 120 plántulas de almacigo para cada uno de los cuatro tratamientos.

Tipo de Muestreo

Se realizó un muestreo Aleatorio Simple con ayuda del Software WinEpiscope 2.0.

Criterios de Inclusión y Exclusión

Las plántulas muestreadas fueron seleccionadas con la ayuda de técnicos colaboradores de BIOTECHNICA S.A, en base a:

- a. Plántulas del invernadero que no hayan sido tratadas con otro tipo de nematicida.
- b. Que se encuentren en los límites del invernadero de Biotechnica S.A.
- c. Que los almácigos sean hechos en mismo periodo de tiempo (mayo 2021).
- d. Las semillas y plantas sean de la misma variedad.
- e. Que hayan tenido el mismo proceso de germinación.

Diseño Experimental

Condiciones de Cultivo

Se utilizaron semillas de café variedad “Caturra”, las cuales se sembraron en maceteras plásticas, previamente desinfectados. Para la siembra se utilizó como sustrato una mezcla de suelo infectado con nematodos proveniente de las fincas cafetaleras de referencias San Luis y Santa María de Ostuma. Se aplicaron fertilizantes correspondiendo a la carta técnica de las fincas cafetaleras de referencia.

Se estableció el experimento unifactorial en un Diseño de Bloques Completos al Azar (BCA) en el cual se ensayaron cuatro tratamientos para invernadero. Se expusieron dos Bloques homogéneos los cuales contenían 5 repeticiones de cada uno de los tratamientos. Los tratamientos se identificaron mediante un código y color (Fig. 8). Cada tratamiento tenía asignando 120 plántulas del almacigo.

Descripción de Tratamientos

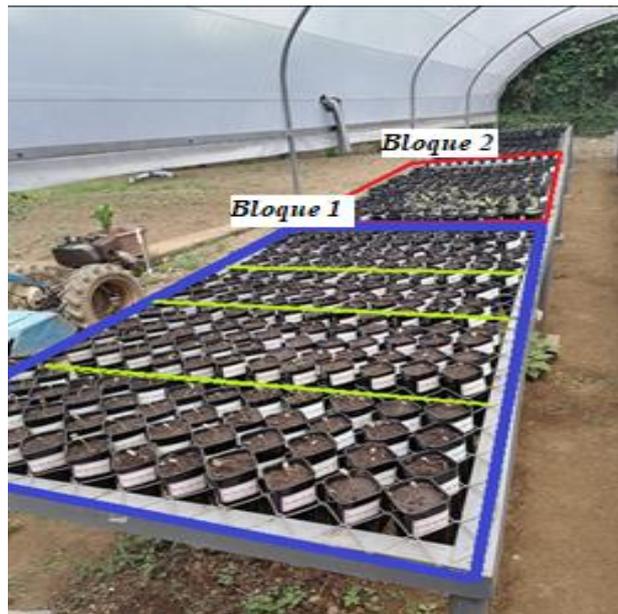
La terapia con los hongos *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum* se obtuvo a partir de la aplicación de **Bioconsorcio Nematicida** ®, producto elaborado por Biotechnica S.A, Es un bioinsumo microbiano concentrado a base de *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum*, que en funcionan en sinergia, otorgando propiedades bioprotectoras al cultivo, como

la mejora de la disponibilidad de fosforo, aumenta las defensas de las plantas contra el ataque de nematodos.

Figura 8.

Patrón de distribución de los tratamientos en los bloques del almácigo. Abreviaturas: B: Bloques, T2: Media Dosis, T3: Dosis Normal, T4: Doble Dosis. Líneas verdes, marcan las repeticiones de cada bloque

B1				B2			
T1	T4	T3	T2	T2	T4	T1	T3
T4	T2	T1	T3	T2	T1	T4	T3
T4	T2	T3	T1	T3	T4	T1	T2
T2	T4	T1	T3	T2	T3	T1	T4
T1	T3	T2	T4	T3	T4	T2	T1



La terapia con los hongos *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum* se obtuvo a partir de la aplicación de **Bioconsorcio Nematicida**®, producto elaborado por Biotechnica S.A, Es un bioinsumo microbiano concentrado a base de *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum*, que en funcionan en sinergia, otorgando propiedades bioprotectoras al cultivo, como

la mejora de la disponibilidad de fosforo, aumenta las defensas de las plantas contra el ataque de nematodos.

Tabla 1

Tratamientos evaluados en el estudio evaluativo *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum* como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos en cultivos de café.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCION DE LOS TRATAMIENTOS	DOSIS UTILIZADAS
1	Testigo	Sin <i>P. chlamydosporia</i> y sin <i>P. lilacinum</i>
2	Bioconsorcio Nematicida ®	375 ml/mz
3	Bioconsorcio Nematicida ®	750 ml/mz
4	Bioconsorcio Nematicida ®	1500 ml/mz

Bioconsorcio Nematicida ® 375 ml/Mz: a mitad de dosis por el fabricante: 375 ml/Mz-1 con una concentración expuesta en la etiqueta de *Pochonia chlamydosporia* 1×10^8 ufc/ml y *Purpureocillium lilacinum* 1×10^8 ufc/ml. Se aplicaron 13.125 ml con una regadera de con 7l de agua.

Bioconsorcio Nematicida ® 750 ml/Mz: dosis recomendada por el fabricante: 750 ml/Mz-1 con una concentración expuesta en la etiqueta de *Pochonia chlamydosporia* 1×10^8 ufc/ml y *Purpureocillium lilacinum* 1×10^8 ufc/ml. Se aplicaron 26.25 ml con una regadera de con 7l de agua.

Bioconsorcio Nematicida ® 1500 ml/Mz: dosis duplicada: 1500 ml/mz-1. Con una concentración expuesta en la etiqueta de *Pochonia chlamydosporia* 1×10^8 ufc/ml y *Purpureocillium lilacinum* 1×10^8 ufc/ml. Se aplicaron 57.5 ml con una regadera de con 7l de agua.

Tratamiento Testigo: Sin *P. chlamydosporia* y sin *P. lilacinum*.

Materiales y Métodos

Tabla 2

Lista de quipos

EVALUACIONES DE LABORATORIO	EXPERIMENTO EN INVERNADERO
Balanzas digitales	Pots
Autoclave	Cintas métricas
Micropipetas	Palas
Cabina de flujo laminar	Bolsas zip-lock
Refrigerador	Cintras métricas y “pie de rey”
Microscopio	Tamices
Cubre objetos y laminas porta objetos	Cajas de pesado
Asas bacteriológicas	Pesa / balanza.

Tabla 3

Lista de medios, reactivos químicos y desechables

EVALUACIONES DE LABORATORIO
Papa Dextrosa Agar
Azul de Lactofenol
Alcohol
Platos petri
Tubos cónicos
Gasas
Parafilm
Agua destilada estéril

Etapa 1: Identificación de Poblaciones de Nematodos Fitopatógenos

Recolección de Muestras.

La selección de las plantas en almacigo se realizó al azar y todos los tratamientos tuvieron el mismo procedimiento, si la planta no existía en la macetera seleccionada al azar se tomó como muestra la del lado que se acuerde previamente. Se realizaron dos muestreos al mes.

- 1) En total se seleccionaron 10 plantas por cada tratamiento.
- 2) Las muestras de raíz y suelo extraídas (10 submuestras) serán colocadas en una bolsa rotulada externamente con la fecha de muestreo y el nombre del tratamiento.
- 3) El mismo procedimiento se realizó para cada tratamiento.
- 4) Se pesó en una báscula quintalera el peso neto en gramos la bolsa con el contenido de suelo/raíz.
- 5) Una vez concluido el proceso de separación de las raíces con el suelo, las raíces fueron lavadas sin ser afectadas.
- 6) Las raíces limpias fueron colocadas en una lámina de color blanco, de forma gradual, por crecimiento o afectación.
- 7) Se fotografiaron las plántulas, incorporando en la foto el nombre del tratamiento, la fecha y el número de muestra.
- 8) Los datos obtenidos en los pasos anteriores, estos quedarán escritos en el cuaderno de bitácora de la valoración.

Extracción de Nematodos del Suelo.

Las muestras de suelo deben ser tamizadas y homogenizadas antes de la extracción de los nematodos presentes, como se describe a continuación:

1. Para evitar dañar a los nematodos que son muy susceptibles a la manipulación, los terrones y los grumos se rompieron cuidadosamente.
2. Para la extracción de piedras y otros residuos vegetales, el suelo se tamizó, sobre un plástico o una placa, a través de un tamiz con una malla de entre 2 y 4 cm.
3. Se tomaron al azar pequeñas porciones del suelo hasta obtener la cantidad necesaria de muestra 500g de suelo.

Método de Embudo de Baermann (1917).

1. Se tomó una submuestra de suelo de 100g y se envolvió en una gasa para hacer una bola suelta.

2. Se comprobó que el embudo esté limpio. Se llenó el embudo con agua hasta que llegue a 1 cm por debajo del borde, luego se colocó en un soporte con un tubo de goma dentro de un tubo cónico.
3. Se colocó la gasa en el embudo con la muestra de manera que quede completamente sumergida, pero sin tocar el fondo del embudo. Los nematodos se arrastraron fuera del material y se asentaron en el tubo.
4. La solución de nematodos se desmontó después de 72 horas. Se agregó agua con regularidad para mejorar la vitalidad de los nematodos.

Identificación de Nematodos.

Para la debida identificación de los nematodos fitopatógenos se utilizó un microscopio óptico para clasificar los géneros de nematodos, utilizando claves morfológicas que se basan principalmente en el análisis de las extremidades caudales y craneales, aunque otras características son significativas en algunos géneros, como la longitud, la forma del esófago o los sistemas reproductivos. Estas claves fueron clasificadas, detalladas, representadas y caracterizadas por Hunt et al. (2018) y Perry & Moens (2013) en sus respectivos libros, estos serán utilizados para lograr identificar los géneros de los nematodos encontrados en las muestras y las fases de estadios en los que estos se encuentran. Los datos de conteo se almacenaron en una base de datos. Estos datos obtenidos se mostraron a través de gráficos y porcentajes de las fluctuaciones de los diferentes géneros de nematodos fitopatógenos presentes en café.

Etapa 2: Verificación Calidad Microbiológica del Formulador Líquido Bioconsorcio Nematicida

Caracterización de Aislados de *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum*.

Los aislamientos utilizados en esta investigación son del Producto Bioconsorcio Nematicida perteneciente a Biotechnica S.A. Se utilizaron como cepas de referencia el BT06-01 y BT10-01 del banco de Cepas de Referencia de Biotechnica S.A, *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* respectivamente. En este trabajo se verificó morfológica y microscópicamente la identificación de especies de aislados de *Purpureocillium lilacinum* y *Pochonia chlamydosporia*.

Los aislados de *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* se cultivaron en los medios de cultivo PDA (agar papa dextrosa) se produjeron en placas de Petri de 90 mm de diámetro para la caracterización macroscópica y microscópica de las cepas BT06-01 Y BT10-01. Se crearon 2 placas para cada medio de cultivo y se incubaron a una temperatura de 25°C. Se realizaron observaciones visuales a partir del tercer día de incubación, incluido el aspecto de la colonia (esporulado, pulverulento), crecimiento vertical, crecimiento circular, color de la colonia al principio y al final del desarrollo, y color de la colonia en la parte superior. y el fondo del plato. Los portaobjetos de vidrio se prepararon retirando una pequeña cantidad de micelio de la placa con la técnica de cinta adhesiva, agregando gotas del colorante láctico azul (azul de lactofenol), para la observación de conidióforos bajo el microscopio e identificación morfológica basada en la clave de clasificación de Humber (2012).

Concentración de Conidios por Mililitro del Producto Formulado.

Se valuó la concentración y viabilidad de los conidios. Se hicieron dos repeticiones de lecturas al microscopio. Para el conteo de conidios se empleó el criterio de diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) del producto Bioconsorcio Nematicida.

La primera dilución se realizó colocando 1 ml del producto en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril, y la segunda dilución se realizó utilizando una micropipeta estéril para transferir 1 ml de la primera dilución a un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua. Esto se agitó con ayuda de un vortex durante un minuto, hasta que se logró una tercera suspensión de 10^{-3} . Este método se repitió hasta alcanzar una dilución de 10^{-5} , momento en el cual se realizó el conteo.

Se recolectó una alícuota de la suspensión de conidios utilizando una micropipeta y se colocó en la cámara de conteo (Neubauer), los conidios se contaron utilizando un microscopio de luz (objetivo 40X) con dos lecturas por repetición.

Debido a que los conidios de *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* son diminutas, se emplearon cuadrados secundarios con un factor de cámara de 250.000, con cinco cuadrados secundarios contados a partir del cuadrado central principal y obtenido el promedio. Debido a que la dilución de conteo fue 10^{-5} , el factor de dilución fue 10,0000. Se utilizó la siguiente fórmula (Gómez, et al., 2014) para calcular la concentración de conidios por mililitro:

Número de conidas/ml = No. de conidas x factor de cámara x factor de dilución

Si el producto tiene una concentración de mayor o igual que 10^8 , está apto para ser utilizado en campo.

Viabilidad de los Conidios.

La prueba de viabilidad de los conidios se realizó en Agar-agua al 2 por ciento que había sido esterilizada en autoclave a 1,5 bar de presión y 121°C de temperatura. El medio se colocó en cajas de Petri previamente esterilizadas y se dejó reposar durante unos minutos hasta que se produjo la solidificación, después de lo cual se dejaron caer 1 alícuota de las diluciones previas de la suspensión fúngica y seguidamente se realizó un rayado por esparcimiento con asa en cada caja de Petri.

Contando el número de conidios germinados y no germinados y dividiendo el primero por el número total de conidios observados se obtuvo el porcentaje de viabilidad. Las lecturas se tomaron en microscopios ópticos con objetivo 40X a las 24 horas de colocadas las alícuotas en el medio, contándose al menos 200 conidios en cada montaje. Para realizar el cálculo se utilizó la siguiente fórmula (Gómez, et al., 2014):

$$\text{Germinación (\%)} = \frac{\text{No. de conidias germinadas}}{\text{No. de conidias totales}} \times 100$$

Si el resultado es igual o superior al 85 % se considera que la viabilidad del producto es satisfactoria.

Pureza del Producto Formulado.

Se determinó si el producto terminado es puro o incluye impurezas no deseadas. El procedimiento fue el siguiente: Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} , se sembró 200 μm de la dilución final en placas con medios de cultivo PDA, se sembraron tres placas e incubaron por cinco días a 25°C . Se calculó y promedió el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de los contaminantes y UFC del hongo. Se dividió la dilución por el volumen utilizado y multiplicó por el inverso de la dilución. Aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Pureza} = \frac{\text{UFC h e}}{\text{UFC t}} \cdot 100$$

UFC he = Unidades Formadoras de Colonias del hongo evaluado

UFC t = Unidades Formadoras de Colonias totales

Etapa 3: Efectividad de los Hongos Nematóforos Pochonia chlamydosporia y Purpureocillium lilacinum Como Biocontroladores de Nematodos Fitopatógenos

Población Final de Nematodos y Factor de Reproducción de Acuerdo a Oostenbrink (1966).

La población final del nematodo se calculó mediante el número de nematodos extraídos de la raíz y el número aproximado de vermiformes en el suelo. Para obtener este último valor, se extrapolan los resultados obtenidos de analizar 100g de suelo al volumen total de la maceta. El Factor de reproducción se calculó por: población final x Población inicial-1. La población inicial corresponde al número de nematodos extraídos al momento de la siembra.

Reaislamiento de *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* en Muestras de Suelo.

Para realizar el reaislamiento de los hongos nematóforos del suelo se utilizó la submuestra de las 10 muestras homogenizadas de suelo por tratamiento. Se utilizó el método de dilución en serie para el aislamiento de los hongos del suelo de cada uno de los tratamientos. Se preparó una dilución madre con 50 g en 450 ml de agua destilada estéril, se agitó durante 4 minutos obteniéndose una suspensión homogénea, seguidamente se prepararon las demás diluciones agregando 1 ml de solución en 9 ml de agua destilada estéril. La dilución 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , se distribuyeron 100 μ L en una placa de medio PDA y se cultivaron durante siete días a 25 ± 1 ° C. De igual forma se realizaron los controles de calidad ambiental y el control del agua destilada estéril en cada uno de los muestreos.

Los cultivos de los hongos aislados (de un cultivo de hongos de tres días y siete días de edad) se examinaron macroscópicamente y microscópicamente para identificar las cepas en función de las características morfológicas y culturales de los hongos, como el crecimiento del micelio, la textura de la colonia, la producción de esporas, forma, color, elevación y pigmentos.

La transferencia de micelio con el método de cinta adhesiva a portaobjetos de vidrio microscópicos limpios permitió la inspección microscópica para su identificación. Para mejorar el examen morfológico, los portaobjetos se tiñeron con una solución de azul de lactofenol para aumentar el contraste. Con un aumento de 40x, los portaobjetos preparados se inspeccionaron microscópicamente. Con las características macroscópicas y microscópicas de los aislados se establecieron comparaciones con las claves taxonómicas de *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum*.

Prueba de Abbott (1925) Corregida.

Las variables relacionadas con el patógeno: índice de agallamiento, J2/100 g de suelo y nematodos/100g de suelo se convirtieron en porcentajes de eficiencia utilizando la fórmula de Abbott (1925).

$$Eficacia (\%) = \frac{a - b}{b} * 100$$

Donde:

a= tratamiento con mayor grado de eficacia (tratamiento con menor valor)

b= tratamiento testigo (máximo valor, menor grado de efectividad)

Etapa 4: Correlación Entre los Niveles de Eficacia de los Tratamientos de Pochonia chlamydosporia y Purpureocillium lilacinum Como Biocontroladores de Nematodos Fitopatógenos y las Variables Agronómicas de las Plantas.

De junio a diciembre de 2021, se llevó a cabo un experimento de invernadero en BIOTECHNICA S.A. Las semillas germinadas de café se obtuvieron de la finca de Santa María de Ostuma y San Luis.

Se llenaron maceteras de plástico con 20cm de diámetro con 1000 g de mezcla de suelo con nematodos y se colocaron en invernadero a una distancia de 10 cm. Las semillas se replantaron en macetas que contenían la mezcla de tierra. Se organizaron cuatro tratamientos en un diseño de bloques completos y aleatorizados con 5 repeticiones para cada experimento. El Bioconsorcio Nematicida con *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* se aplicó a una tasa de aproximadamente de 1×10^8 esporas por maceta. Las plantas se regaron dos veces al día con 50 ml de agua según el porcentaje sugerido por el cultivo.

Incorporación de los Tratamientos Fúngicos al Suelo.

Se calculó y pesó la cantidad de inóculo utilizado en cada tratamiento. De manera localizada, de acuerdo con la distribución del diseño experimental, se integró el inóculo líquido al suelo de las maceteras de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml con ayuda de una regadera de mano. Se administraron solo dos inoculaciones, una a los 70 días después de siembra y otra a los 75 días después de aplicación.

Recopilación de Datos.

Las plantas se recolectaron dos meses después de que comenzara el experimento y se midieron los siguientes parámetros.

1. Longitud de la planta (raíz + brote)
2. Peso fresco de la planta (raíz + brote)
3. Peso fresco de la raíz y brote

Se midieron la longitud de la planta, los pesos frescos y se calcularon los valores medios. Se midió la longitud de la planta (desde la superficie del suelo hasta la punta de la hoja bandera). Se calculó el peso fresco de los brotes. Los sistemas de raíces se tomaron de las macetas, se lavaron para eliminar las partículas de suciedad y se pesaron.

De igual manera se contabilizará las raíces sanas y las raíces afectadas que muestren síntomas de infección por nematodos. Seguidamente se registrarán los datos de las plántulas vivas y muertas de cada tratamiento. La magnitud de la enfermedad del sistema radicular se medirá mediante la observación del índice de agallas en las raíces infestadas y mediante la escala 0-10 (0: sin agallas; 7: 100 por ciento de las raíces presentan agallas; 10: no sistema de raíces, planta muerta)

Correlación Entre Eficacia y Variables.

Implicó hacer un análisis estadístico comparativo de las características de los nematodos fitopatógenos y el comportamiento de las variables agronómicas en una relación de causa-efecto. Para ello se empleó la prueba del Coeficiente de Correlación de Pearson, que consiste en establecer comparaciones entre variables elegidas a criterio del investigador en función del objetivo de la información a generar. Es una medida de la fuerza de la relación lineal entre dos o más variables. El coeficiente de correlación de Pearson se calculó haciendo uso del programa SPSS versión 20.

La covarianza de los valores muestrales estandarizados está representada por el coeficiente de correlación muestral (r). Asume valores en el rango $[-1:1]$, con el signo que indica la dirección de la asociación (los valores negativos ocurren cuando la tendencia promedio indica que, si un valor en el par observado es mayor que su media, el otro valor es menor que su media).

Análisis Estadístico

Los datos se analizaron mediante ANOVA y se realizó una comparación mediana del 5 por ciento de probabilidad utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Duncan. Sobre las variables morfológicas de la planta y los índices de nematodos, se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson. Las diferencias entre las medias se examinaron utilizando el programa estadístico SPSS versión 20.

Operacionalización de Variables

VARIABLES	SUBVARIABLES	INDICADOR	VALORES	ESCALA	UNIDAD DE MEDIDA
Variedad de Café	▸ Genero	▸ Taxonomía		▸ Nominal	
Identificación de nematodos	Características morfológicas	<ul style="list-style-type: none"> ▸ Sexo y dimorfismo sexual ▸ Tamaño y forma del cuerpo <ul style="list-style-type: none"> ▸ Cutícula ▸ Región cefálica ▸ Estilete y esófago ▸ Intestino, prerrecto, recto y ano. ▸ Sistema reproductivo femenino. ▸ Sistema reproductor masculino <ul style="list-style-type: none"> ▸ Cola 	<ul style="list-style-type: none"> ▸ <i>Meloidogyne spp.</i> ▸ <i>Pratylenchus spp.</i> ▸ <i>Helicotylenchus spp.</i> ▸ <i>Rotylenchulus spp.</i> 	▸ Nominal	
	Fase de estadios	▸ Morfología	<ul style="list-style-type: none"> ▸ Adultos ▸ Juveniles de segunda etapa (J2) 	▸ Ordinal	
Densidad poblacional de nematodos	Densidad en suelo	▸ Recuento por campo	<ul style="list-style-type: none"> ▸ numero de nematodos / g de suelo ▸ J2 / g de suelo 	▸ Razón	<ul style="list-style-type: none"> ▸ N/g ▸ J2/g
Control de calidad microbiológica del producto	Caracterización de las cepas	▸ Morfología	<ul style="list-style-type: none"> ▸ <i>Pochonia chlamydsporia</i> ▸ <i>Purpureocillium lilacinum</i> 	Ordinal	
	Concentración	▸ Recuento en platos	▸ <i>Pochonia chlamydsporia</i>	▸ Razón	▸ UFC

			▸ <i>Purpureocillium lilacinum</i>		
	Porcentaje de germinación y pureza	▸ Recuento en platos	▸ <i>Pochonia chlamydosporia</i> ▸ <i>Purpureocillium lilacinum</i>		%
Evaluación de <i>Pochonia chlamydosporia</i> y <i>Purpureocillium lilacinum</i>	Colonización de raíces	▸ Presencia o ausencia de estructuras fúngicas	▸ <i>Pochonia chlamydosporia</i> ▸ <i>Purpureocillium lilacinum</i>	▸ Razón	▸ UFC/g
	Parasitismo de huevos	▸ Estructuras parasitadas por <i>Pochonia chlamydosporia</i> o <i>Purpureocillium lilacinum</i>	▸ Presencia ▸ Ausencia	▸ Ordinal	
Evaluación fisiológica de las plantas	Longitud de la planta	▸ Medición		▸ Razón	▸ cm
	Peso fresco de parte aérea de la planta	▸ Pesaje		▸ Razón	▸ g
	Peso fresco de las raíces	▸ Pesaje		▸ Razón	▸ g
	Presencia de lesiones por fitopatógenos	▸ Síntomas de enfermedad por nematodos	Raíces oxidadas Raíces con lesiones	▸ Razón	%

Índice de agallas	▸ Escala de Brigde y Page	▸ 0-10	▸ Ordinal	Índice de agallas
-------------------	------------------------------	--------	-----------	-------------------

CAPÍTULO IV: Resultados y Discusión

Identificación de las Poblaciones de Nematodos Fitopatógenos que se Encuentran Asociados al Cultivo de Café

Se encontraron nematodos parásitos de plantas en 27 de las 28 muestras de suelo analizadas. Se recuperaron 6 géneros. *Meloidogyne spp* (49.75%) y *Pratylenchus spp* (22.10%) fueron las especies endoparásitos más encontradas en el total de muestras de suelo, con un promedio de 33.6 ± 71 y 14.1 ± 14 individuos por gramo de suelo. Otro nematodo endoparásito, como *Rotylenchus spp.* se encontró en bajas densidades y frecuencias. *Helicotylenchus spp.*, *Xiphinema spp.* y *Tylenchus spp.* fueron las especies ectoparásitos más comunes encontradas en muestras de suelo. Estas últimas especies se encontraron en 16.77, 16.77 y 16.70% de las muestras, respectivamente, con densidades de población promedio de 10.7 ± 13 , 11 ± 12 y 8.7 ± 14 individuos por gramo de suelo.

Tabla 4

Frecuencia de ocurrencia y densidad de población de los principales nematodos parásitos de las plantas registradas en café.

Genero Nematodos	Densidad de población / 100 g de suelo		
	Frecuencia de ocurrencia (%)	Media	Máximo
<i>Meloidogyne spp.</i>	49.75	33.6 ± 71^b	333
<i>Pratylenchus spp.</i>	22.10	14.1 ± 14^{ab}	45
<i>Helicotylenchus spp.</i>	16.77	10.7 ± 13^a	42
<i>Xiphinema spp.</i>	16.70	11 ± 12^a	42
<i>Tylenchus spp.</i>	14.93	8.7 ± 14^a	56
<i>Rotylenchus spp.</i>	1.00	2.1 ± 5^a	14

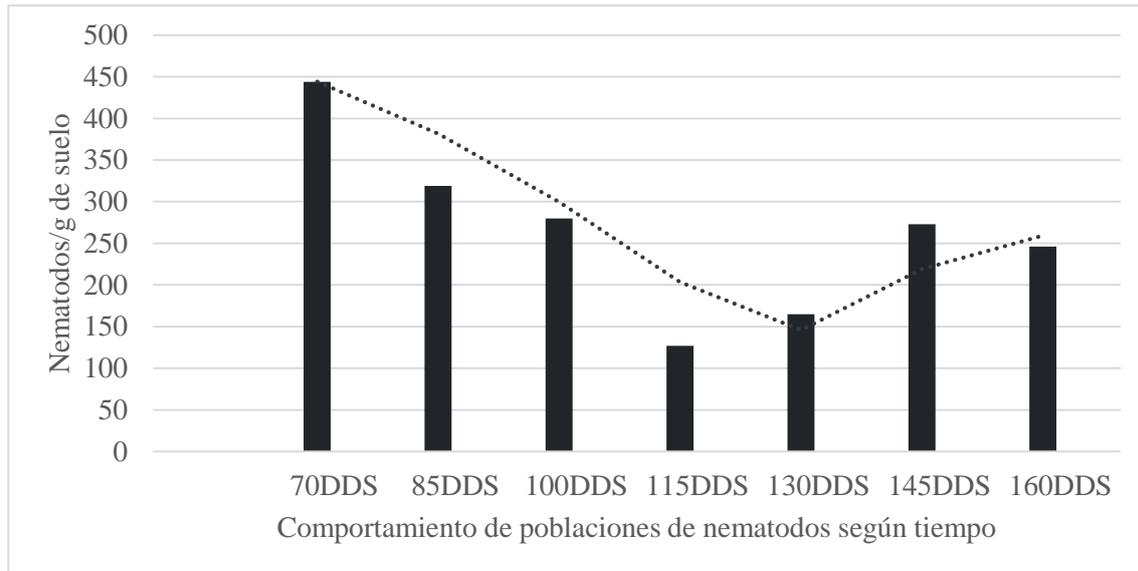
Medias con letras iguales, no difieren significativamente, según Duncan ($p \leq 0.05$)

Debido a las variadas temporadas de muestreo, hubo diferencias en la abundancia general de nematodos. Las densidades de población de *Helicotylenchus* y *Xiphinema* fueron menores en 130 días después de siembra (DDS) y 88 DDS respectivamente. En todas las

temporadas de muestreo, la densidad de nematodos de *Meloidogyne* y *Pratylenchus* fue comparable. Las poblaciones de *Tylenchus* y *Rotylenchus*, por otro lado, no se encontraron o se encontraron pocos individuos después de los 114 DDS y solo se encontraron con poca frecuencia durante los 70 y 100 DDS.

Figura 9

Comportamientos de poblaciones de nematodos fitopatógenos durante el periodo de estudio. DDS: Días después de siembra.



Como parásitos del café, se descubrió una gran cantidad de nematodos fitopatógenos endoparásitos y ectoparásitos los cuales se encuentran en la lista Nacional de plagas que afectan el cultivo del Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA ,2020). La mayoría de las especies descubiertas se han identificado previamente durante estudios en Nicaragua y / o en otros países. Múltiples autores han reportado encontrar los géneros *Pratylenchus* y *Meloidogyne* asociados a cultivos de café. Nuestros resultados coinciden en gran medida con los de Pérez (2019), indicando que los géneros de mayor importancia en fincas cafetaleras de Nicaragua son *Meloidogyne spp* (47%), *Pratylenchus spp* (30%) y *Helicotylenchus spp* (23%). *Meloidogyne spp.*, tuvo la mayor abundancia y frecuencia de todos los géneros de nematodos fitopatógenos en nuestra investigación. Aunque *Meloidogyne spp.* no se aisló directamente de las raíces del café, su prevalencia sugiere que los miembros de este género probablemente parasitan el café.

Herrera et al. (2011) plantea que las poblaciones del género *Meloidogyne spp.* fueron superiores a las poblaciones de *Pratylenchus spp.*, como ocurrió en este estudio. Así mismo

(Villain et al., 2002). reportan afectación de estos mismos géneros en todas las áreas donde se siembra café. Un factor que pudiera estar influenciando en la presencia de estos géneros es la variedad establecida en las fincas en estudio como es el caso de la variedad caturra, la cual es reportada como susceptibles al ataque nematodos (Bertrand et al., 2000).

Es importante mencionar que a pesar de que los géneros reportados *Meloidogyne spp.* y *Pratylenchus spp.* exhiben hábitos alimenticios diferentes y que ambos están asociados estrechamente al cultivo del café, Herrera et al., (2011), menciona que la incidencia y densidades poblacionales de ambos géneros estarán determinadas por las condiciones ambientales que les rodean. En este sentido, probablemente las diferencias en las densidades poblacionales de ambos géneros en las fincas el Jilguero y Linda Vista están influenciadas por el manejo agronómico, siendo uno de los principales aspectos a considerar, la sombra. Las poblaciones de *Meloidogyne spp.* se presentan en ambientes más soleados y por el contrario las poblaciones de *Pratylenchus spp.* en condiciones con mayor sombra. Un aspecto muy importante para considerar en nuestro estudio es la presencia de *Helicotylenchus spp.* cuya presencia está asociada a la sombra utilizada en café como es el caso de cítricos y musáceas.

Calidad Microbiológica de la Formulación del producto Bioconsorcio Nematicida

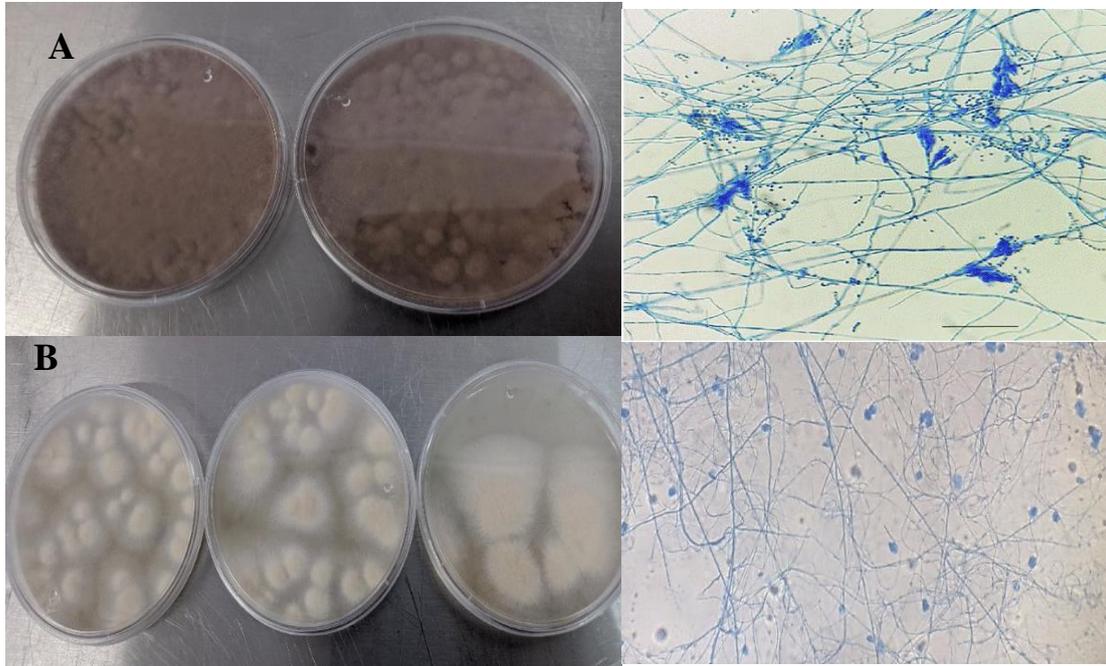
Caracterización de Aislados de Pochonia chlamydosporia y Purpureocillium lilacinum

La identificación morfológica, tanto macroscópica como microscópica, resultante de los aislados de Bioconsorcio Nematicida coinciden con las descripciones generales de Zhnag y Hyde (2014). Para *Pochonia* las colonias formadas en agar fueron blancas, con un tono ocre pálido, amarillo y algodonoso en el reverso. Muestran un patrón de desarrollo consistente con la creación de anillos concéntricos con un aspecto algodonoso. Microscópicamente, consiste en fiálides verticilos simples que varían en longitud de 17 a 24 μ m. Conidios agrupados en cabezas falsas en los extremos de las fiálides, en su mayoría esféricos y elipsoidales, con dimensiones de 2.5-4 μ m x 2-2.5 μ m. La presencia de clamidosporas que miden 15-23 μ m de longitud y 17-27 μ m de diámetro.

Para *Purpureocillium*, los conidios fueron fusiformes o elipsoidales, de paredes lisas y se reproducen en una cadena de 2,5 a 3 μ m de largo y 2 a 2,2 μ m de ancho. Las colonias del centro desarrollaron tonalidades púrpuras o lilas fuertes, mientras que las colonias de los bordes se tornaban incoloras o blancas.

Figura 10

Evaluación de la germinación de conidios de *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum*. a) Cortes de medio de cultivo AA con conidios de *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum*. b) Conidios de *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* germinados y no germinados.

**Concentración de Conidios por Mililitro del Producto Formulado**

Se verificó que el producto tuviera la concentración, viabilidad y pureza necesaria para evitar contaminaciones cruzadas y fallos en dosificaciones. La concentración fue determinada utilizando el recuento en Cámara de Neubauer. La concentración de la formulación del producto Bioconsorcio Nematicida correspondió a 2.1×10^8 UFC/ml. Esto se ha observado para otros hongos y formulaciones comerciales, como *Beauveria bassiana*, que mostró un aumento en la resistencia a las altas temperaturas, conservó la virulencia y mantuvo la viabilidad de los conidios a lo largo del tiempo en una formulación de aceite surfactante (Cardona, et al., 2014).

Viabilidad y Pureza de los Conidios

Los resultados obtenidos en cuanto a la viabilidad de la formulación del producto Bioconsorcio Nematicida de los conidios a temperatura ambiente demuestran que la viabilidad de los conidios no tiene tendencia a disminuir. La viabilidad de germinación de conidios fue mayor a 90%, los porcentajes óptimos de germinación (90%) se relacionaron con una temperatura ambiente de 25 grados Celsius (Figura 11). La germinación se mantuvo entre 89 y 95%, lo que es ideal en una formulación comercial (Figura 11).

Cabe señalar que, durante el período de investigación, la formulación se proporcionó como una solución homogénea sin crecimientos miceliales en la superficie, como fue el caso de los controles. Varios autores han reportado técnicas de formulación que no dañan las esporas y, por el contrario, aumentan la estabilidad y vida útil de estas estructuras (Bastidas et al.), tal como lo hicieron en este estudio.

La concentración de conidios, así como su viabilidad, es fundamental en el proceso de evaluación de formulaciones de bioplaguicidas, ya que esta información determina cuánto tiempo puede permanecer el producto en condiciones de almacenamiento. La concentración de conidios permite determinar el número de unidades infectivas por unidad de peso, así como asegurar que la formulación contenga la cantidad de conidios requerida para el control en campo respetando la concentración recomendada de 10^8 conidios/ha (Gómez, et al., 2014). La viabilidad del hongo es crítica porque, cuando se rocía en el campo, debe tener un efecto rápido en la población de nematodos objetivo para limitar el tiempo de exposición a las condiciones ambientales.

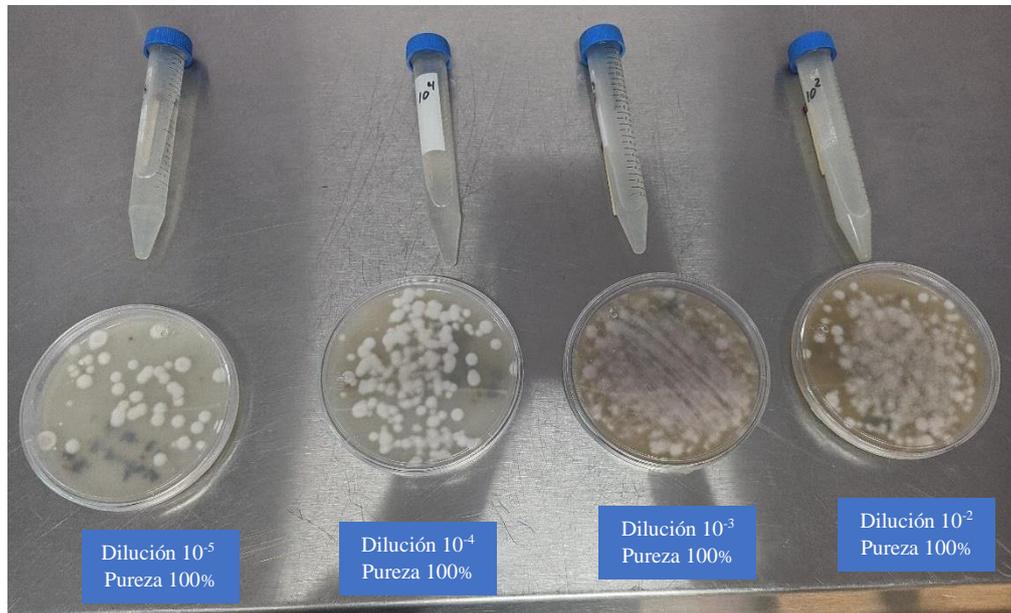
Las cepas *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* tuvieron un alto porcentaje de germinación en la formulación y tampoco presentaron antagonismo entre ellas, con un promedio de 95,83% y 89,66%. En consecuencia, se considera una buena formulación, según Gómez et al. (2014), quienes afirman que una formulación comercial debe tener una tasa de germinación superior al 85% en un período de incubación de 24 horas.

La pureza fue del 100% en todas las diluciones, que, según los criterios de control de calidad de los hongos nematófagos, debería ser superior al 90 por ciento (Bastidas, et al., 2009), lo que indica una calidad adecuada de la casa comercial (Biotechnica S.A.).

Según estos hallazgos, la formulación líquida comercial no tuvo un impacto negativo en la germinación o pureza de las estructuras de las cepas BT6 Y BT10 durante los períodos y temperaturas probados.

Figura 11

Viabilidad y pureza de las cepas de *Purpureocillium lilacinum* y *Pochonia chlamydosporia* obtenidos de Bioconsorcio Nematicida.



Efectividad de Diferentes Tratamientos de *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum* Como Biocontroladores de Nematodos Fitopatógenos de Cultivo de Café en Diferentes Períodos de Tiempo

Índice de Agallamiento, Porcentaje de Infección, Densidades de Poblaciones de Nematodos Inicial y Final y Población de Nematodos y J2 en 100 g de Suelo

En la prueba en invernadero, la Tabla 5 indica el efecto de los aislamientos en el desarrollo de agallas en café, el porcentaje de infección por los hongos nematófagos, la población inicial y final de nematodos fitopatógenos y las poblaciones de nematodos y J2 en 100 g de suelo, todos mostrando diferencias significativas en comparación con el tratamiento de control. Los tratamientos T4 y T2 fueron los tratamientos más efectivos en la variable índice de agallamiento, con medias menores a 5 grados en la escala, el control presentó un índice de agallamiento de 5.75 grados, el número de agallas disminuyó considerablemente en plantas tratadas con aislados de hongos.

Las tasas más bajas de infección de nematodos, 8.9 ± 17 y 16.67 ± 6 % se informaron en los tratamientos con T2 y T3, respectivamente (Tabla 5). T4 fue el tratamiento más eficiente en el porcentaje de nematodos infectados obteniendo un 22.50 ± 0 % de infección por los hongos nematófagos *P. chlamydosporia* o *P. lilacinum*. La tasa de infección difirió entre los tratamientos, aunque todos presentaron diferencias significativas en comparación con el testigo.

Las poblaciones de nematodos se redujeron considerablemente en la mayoría de las plantas tratadas con hongos, al relacionar las densidades de las poblaciones finales con las poblaciones iniciales, siendo los resultados menores que 1 los representativos de una disminución y los iguales o mayores a 1 los no representativos, obteniendo así que los demás tratamientos obtuvieron resultados cayendo por debajo de uno en todas las maceteras y fueron significativamente diferentes del control no tratado. ($P \leq 0.05$) (Tabla 5). Las cantidades finales de nematodos y J2 se redujeron en la mayoría de las plantas tratadas con aislados de hongos.

Tabla 5

Efecto de los tratamientos en la población de nematodos y eficacia en su reducción en 100g de suelo.

Tratamiento	Índice de agallas	% De infección	Pf / Pi	Nematodos / 100g de suelo	J2 / 100g de suelo
T1	5.75	0 ^a	1.84 ± 0.3 ^b	82.2 ± 47 ^a	64.2 ± 39 ^a
T2	2	8.9 ± 17 ^b	0.40 ± 0.2 ^{ab}	70.8 ± 47 ^a	44.2 ± 30 ^a
T3	2.75	16.67 ± 6 ^b	1.18 ± 0.3 ^{ab}	53.6 ± 23 ^a	41.8 ± 18 ^a
T4	1.63	22.50 ± 0 ^b	0.27 ± 0.4 ^a	37.7 ± 11 ^a	32 ± 5 ^a

Pf / Pi = relación entre la densidad de población final e inicial; J2= juveniles de segunda etapa
Medias con letras iguales, no difieren significativamente, según Duncan ($p \leq 0.05$)

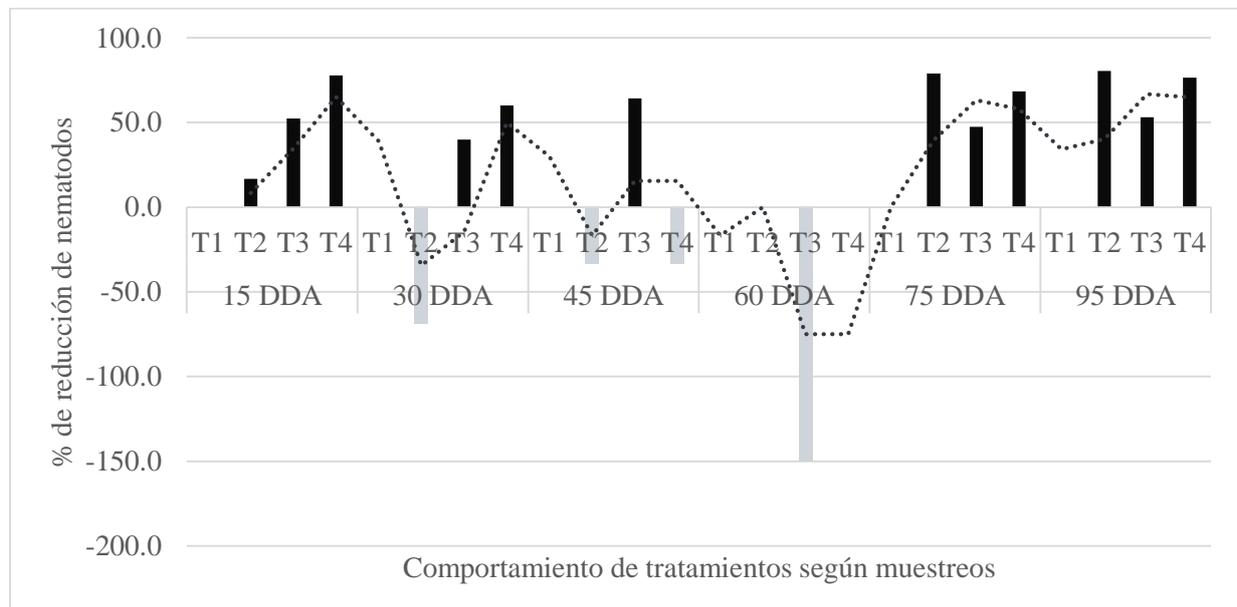
Estas cepas de hongos mostraron potencial como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos en *Coffea arabica* según nuestros criterios. En la Tabla 5 se observa que ninguno de los tratamientos impidió el establecimiento de nematodos fitopatógenos en las plantas; sin embargo, los aislamientos fúngicos tuvieron un efecto favorable en la disminución del índice de agallamiento y reducción poblacional en comparación con el control. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Castillo & Medina (2014) quien obtuvo 4.7 grados al aplicar un producto a base de *Pochonia* contra *M. incógnita* según la escala de índice de agallamiento de Bridge y Page. Mientras que Vincas (2019) aplicando *P. lilacinum* obtuvo un índice de agallamiento de 3.3 muy por debajo del Testigo.

Reducción Poblacional de Nematodos Sobre Testigos en los Tratamientos Durante el Período de Estudio

T2 fue capaz de reducir la población en un 80.5%, mientras que T3 la redujo en un 77.8%. y T4 disminuyó la población de nematodos a 64.3%, respectivamente. (Figura 13). Esto coincide con una cepa *Pochonia spp.* que redujo a la mitad la población de *H. schachtii* en remolacha azucarera (Ayatollahy, et al. 2008). En experimentos recientes en macetas con *Globodera rostochiensis* Woll., aislados de *P. lilacinum* ingresaron a los quistes y destruyeron casi el 90% de los huevos in vitro (Dehghan Nasrabad y Fatemy 2016).

Figura 12

Comportamiento de reducción de población de nematodos sobre los testigos en los tratamientos durante el periodo de estudio. DDA: días después de aplicación.



El efecto de los tratamientos T2, T3 y T4 sobre el porcentaje de reducción de nematodos en suelo se relaciona con los datos obtenidos por Castillo & Medina (2014) quienes determinaron que *Purpureocillium* redujo en un 66% la población de nematodos en tomate. Si bien Leandro (2017) reporta que *Pochonia chlamydosporia* erradicó el 100% de los nematodos de los géneros *Meloidogyne spp.* y *Pratylenchus spp.*, en cuanto al desarrollo agroproductivo de plántulas de café en fase de vivero, esto se relaciona con el estudio de Manzanilla-López & Lopez-Llorca (2017), quienes obtuvieron un control superior al 80% sobre *M. incognita* en *coffea arabica*.

Las cepas probadas fueron efectivas para suprimir las infecciones de los nematodos especificados en *Coffea arabica* como se muestra en la Figura 13. Se muestra siempre un mayor porcentaje de reducción en las áreas tratadas, de igual forma se evidencia una relación directamente proporcional entre la concentración de la dosis y el porcentaje de reducción de nematodos al compararse con los testigos de cada muestreo. La relación entre la infección de nematodos y la abundancia de *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* en la rizosfera es compleja (Atkins, et al. 2009).

Reaislamiento, de P. chlamydosporia y P. lilacinum en Muestras de Suelo

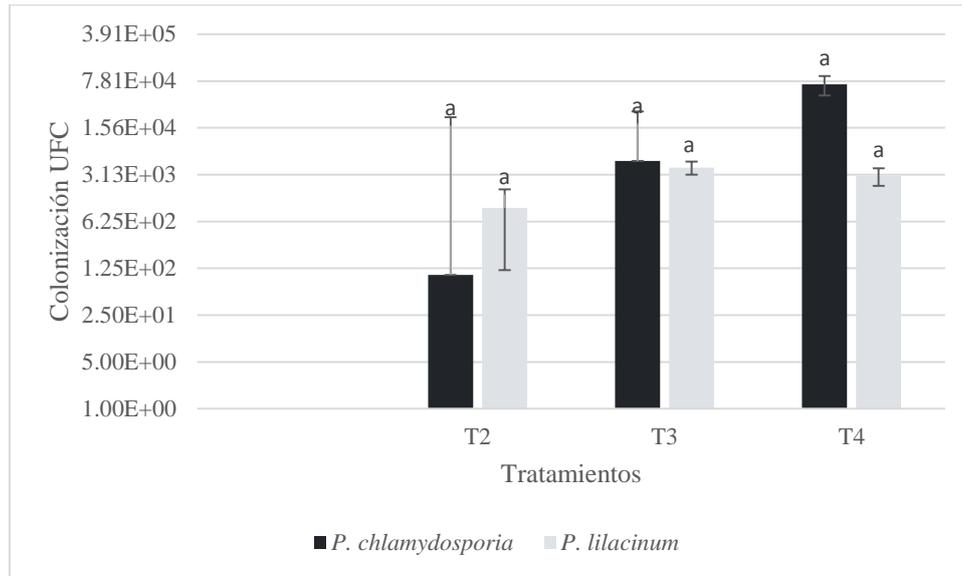
Se analizó el ciclo de crecimiento y aislamiento de las cepas de los tratamientos con las distintas dosis según los principios de los postulados de Koch, se obtuvo la recuperación, identificación de ambos hongos nematófagos en todos los tratamientos con excepción de T1 durante el muestreo 15 DDA, lo cual sugiere que las cepas lograron colonizar la rizosfera de las maceteras, la mayor concentración de los ingredientes activos del bioinsumo fue a los 30 días después de aplicación (DDA) una densidad de 7×10^4 UFC/g de suelo de *P. chlamydosporia* y 3×10^3 UFC /g de suelo de *P. lilacinum*. No se lograron identificar durante los siguientes muestreos las cepas blanco, lo cual sugiere que el espectro de acción y control de los bionematicidas no es mayor a 45 DDA. Por tal razón se realizó una segunda aplicación de los tratamientos luego de los 75 DDA. Dando como resultado un reaislamiento de la cepa *P. lilacinum* a los 90 DDA en una concentración de 2×10^4 UFC/g de suelo.

Aunque infectó hasta el 22.50% de los nematodos, los tratamientos no pudieron desarrollarse en PDA de suelos tratados. Es posible que su cantidad en suelo fuera insuficiente para ser identificada por este enfoque; Sin embargo, en la investigación elaborada por Ebadi, et al. (2018), obtuvieron resultados de hasta 3% de infección, aunque no fueron capaz de aislar sus cepas al muestrear en la investigación. Por ende, las estimaciones de la densidad fúngica basadas únicamente en un medio sólido pueden no ser fiables, ya que no fue posible distinguir entre colonias desarrolladas a partir de micelio o esporas; además, la estimación es compleja para ambos hongos, que generan tanto conidios como clamidosporas. (Manzanilla-López, et al. 2009). De igual forma se obtuvo un fenómeno curioso al presenciar que luego de los 45 DDA no se reaislaban las cepas fúngicas y la densidad poblacional de nematodos fitopatógenos se mantenía igual o incrementaba, a los 75 DDA antes de aplicada la segunda dosis se obtuvo un incremento significativo en la reducción poblacional de los nematodos, tomando en cuenta que ambos hongos son capaces de crear estructuras de resistencias como las clamidosporas, las

cuales resisten mayor tiempo y su germinación es más lenta, se deduce que el efecto de esta reducción fue provocado por la germinación e infección de las clamidosporas presentes en el suelo.

Figura 13

Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* al final del experimento, en suelo y rizosfera de café. El error estándar está indicado por las barras. Abreviaturas: T2: Media Dosis, T3: Dosis Normal, T4: Doble Dosis.



Medias con letras iguales, no difieren significativamente, según Duncan ($p \leq 0.05$)

El uso combinado de diferentes agentes biológicos para combatir múltiples problemas patogénicos dentro de un mismo cultivo es una práctica muy utilizada en la actualidad debido que al aplicarse de manera individual pueden no ser lo suficientemente efectivos causando un mínimo impacto a la hora de controlar el patógeno. Hongos como *Purpureocillium* spp. y *Pochonia* spp., entre otros hongos, son aplicados tradicionalmente en combinación ya que se pueden desarrollar distintos mecanismos de acción (Gallego et al., 2014).

Dado que en los tratamientos que mostraron una buena respuesta de control ($\geq 40\%$), existe la presencia del hongo *Purpureocillium lilacinum*, es pertinente mencionar que es uno de los hongos más conocidos a nivel mundial como controlador de fitonematodos, principalmente de especies del género *Meloidogyne* spp, disminuyendo así las poblaciones en campo (Monzón et al., 2009). Al igual que ésta, otras investigaciones concuerdan con el hecho de que el uso de bioplaguicidas a base de hongos como *P. lilacinum*, debe ser considerado como parte del programa de manejo integrado de plagas, debido a que poseen la capacidad de tener un rápido crecimiento y desarrollo gracias a la agrupación de conidios y ramificaciones laterales. Es

pertinente mencionar que se han realizado varias investigaciones en cuanto al tipo de interacción de *P. chlamydosporia* con otro tipo de hongos y en cuanto a su actividad como controlador biológico. Se ha evaluado su compatibilidad junto con *P. lilacinum* en condiciones in vitro y según Martínez y Suárez (2013), se concluye que no se observaron afectaciones en cuanto al crecimiento micelial entre ambos hongos, por lo que el desarrollo y crecimiento de *P. chlamydosporia* no se ve perjudicado por la presencia de *P. lilacinum*.

Correlación Entre los Niveles de Eficacia de los Tratamientos de *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum* Como Biocontroladores de Nematodos Fitopatógenos y las Variables Agronómicas de las Plantas de Café en Estudio

Variables Agronómicas de las Plantas de Café en Estudio

En la Figura 14 se muestran los hallazgos de las variables longitud, peso total, peso aéreo y peso de la raíz, las cuales muestran diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en comparación con el testigo. Los tratamientos T4 y T2 superan al testigo en cuanto a longitud de planta, con una diferencia estadísticamente significativa. En términos de peso total, todos los tratamientos, no difieren considerablemente del control. T3 y T4 fueron los tratamientos más efectivos para el peso aéreo de las plantas de café en estudio. El peso de la raíz aumentó en los siguientes tratamientos: T3, T4 y T2 ($p=0.05$) (Figura 14 C). Cuando se comparó con la aplicación al suelo de *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia*, demostraron una promoción del crecimiento del café. Ambos hongos mejoraron las características de crecimiento que se habían visto comprometidas por la infección por nematodos.

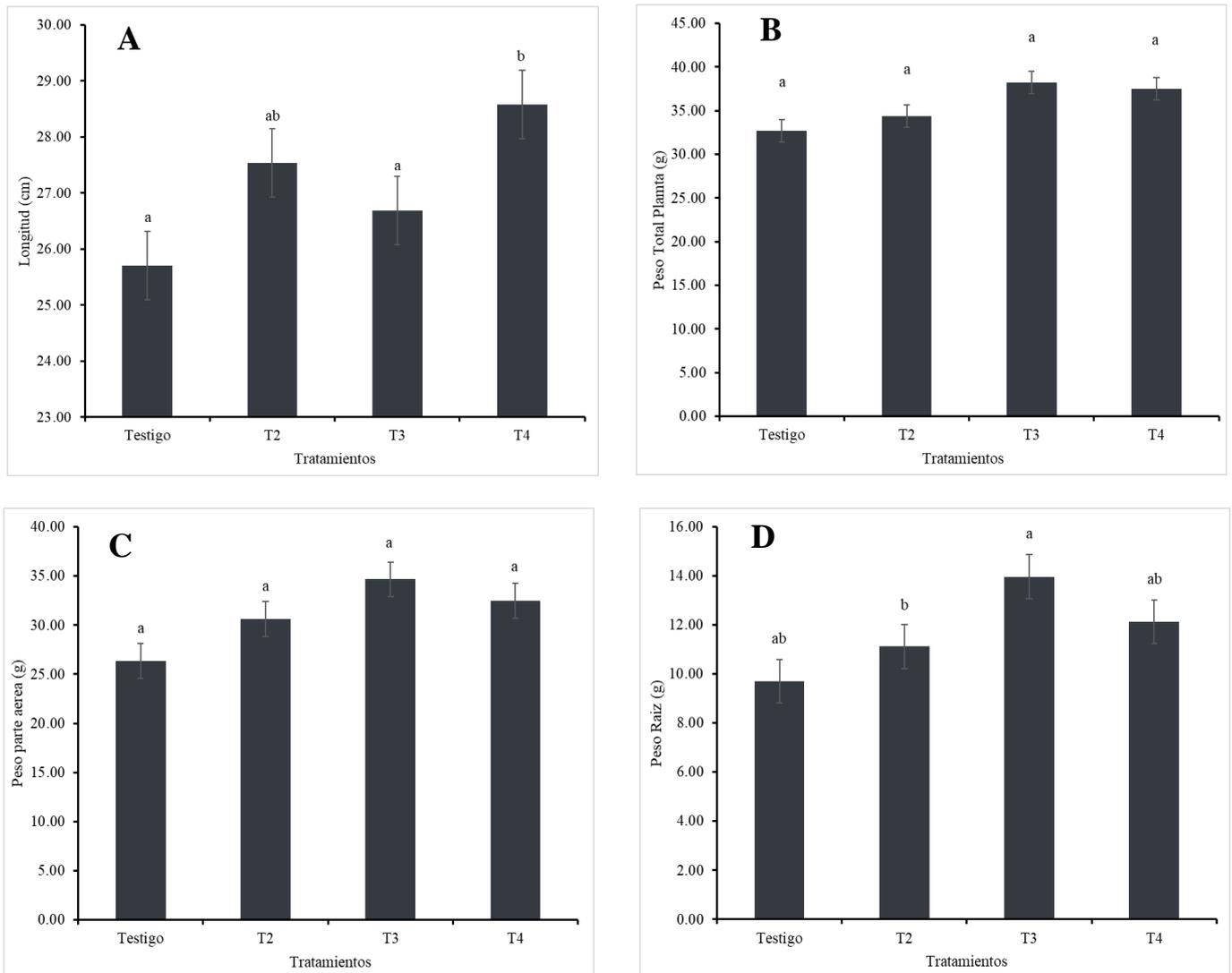
En la Figura 14 se observa que el tratamiento T4 tuvo los mejores resultados de longitud con 28.58 cm y T2 con 27.54 cm. Estos resultados están relacionados con León (2019), quien encontró que al ensayar *Pochonia spp.* en naranjilla obtuvo mayor desarrollo de la planta que el testigo.

En la variable peso de la raíz se determinó que los aislados más efectivos y estadísticamente diferentes fueron T3 con 13.96 g, T4 con 12.12 g y T2 con 11.12 g. Estos hallazgos son similares a los de Nyaku et al. (2017), quien evaluó el efecto de aislados fúngicos con el objetivo de reducir los 43 niveles de infestación de *Meloidogyne javanica*, encontrando un efecto estimulante sobre los parámetros morfológicos, fisiológicos y productivos de la cosecha. De manera similar, cuando Pérez (2019) probó *Purpureocillium lilacinum* para el control de nematodos fitopatógenos, descubrió que este hongo tenía un efecto positivo en las

plantas de café, con valores más altos en las variables peso total de la planta, peso de la raíz y longitud de la raíz.

Figura 14

Crecimiento de plantas de café que han sido tratadas con *Purpureocillium lilacinum* y *Pochonia chlamydosporia*. A) Longitud de la planta; B) Peso total planta; C) Peso parte aérea; D) Peso raíz. El error estándar está indicado por las barras.



Medias con letras iguales, no difieren significativamente, según Duncan ($p \leq 0.05$)

P. lilacinum y *P. chlamydosporia* exhibieron impactos variados sobre las características de crecimiento evaluadas en café en los ensayos controlados, siendo la raíz la más beneficiada. Cuando los dos hongos se combinaron en plantas parasitadas por nematodos, el peso total aumentó sustancialmente. Esto podría atribuirse a un efecto de complementariedad funcional, que consiste en la ventaja particular y distinta que cada especie de hongos nematófagos proporciona al huésped cuando se usa en combinación (Maherali & Klironomos, 2007). Sin

embargo, el peso de la parte aérea no difirió entre tratamientos, pero se obtuvo un crecimiento un tanto mayor en las plantas aplicadas.

El peso de la raíz y la longitud del café aumentaron en presencia de *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia*. En estudios anteriores, se ha encontrado que estos hongos ayudan en el crecimiento de otros vegetales afectados por *M. incognita* (Silva, et al., 2017).

Correlación Entre los Niveles de Eficacia de los Tratamientos y las Variables Agronómicas de las Plantas de Café

La Tabla 6 muestra los coeficientes de correlación de Pearson entre los niveles promedio de efectividad de los tratamientos de *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum* y las variables agronómicas, lo que indica un vínculo positivo entre la longitud y el peso de la raíz y una correlación negativa entre la longitud y el índice de agallas. También se muestra que los índices de agallas tienen una correlación positiva y muy significativa con la población de nematodos en el suelo. Igualmente destaca una correlación positiva directa entre el peso de la raíz y el índice de agallas.

Tabla 6

Correlación entre niveles de efectividad de *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum* y las variables agronómicas en condiciones de invernadero.

Variables	Longitud		Peso de la raíz		Índice de agallas	
	r	p	r	p	r	p
Longitud						
Peso de la raíz	0.79	0.06805				
Índice de agallas	-0.45	0.08475	0.26	0.0247		
Nematodos/g suelo	-0.49	0.5174	-0.47	0.6136	0.84	0.0638

Pearson p-valor (determinado por el programa) r: coeficiente de correlación.

La Tabla 6 muestra los resultados del análisis de correlación para los tratamientos de los hongos nematófagos, que reveló una correlación positiva y altamente significativa entre la longitud y el peso de la raíz ($r = 0.79$; $p = 0.06805$), así como una correlación negativa entre el índice de agallas y la longitud ($r = -0.45$; $p = 0.08475$). Esto sugiere que el índice de agallas tiene un impacto en la longitud, ya que cuanto menor es el índice de agallas, mayor es la longitud.

Además, la variable índice de agallas y la población de nematodos/g de suelo tienen una correlación positiva ($r= 0.84$, $p=0.0638$). Estos hallazgos se detallan en la Tabla 5 y la Figura 14, y muestran que, a mayor longitud, mayor peso de la raíz, con relación a la variable índice de agallas, a menor población de nematodos en el suelo menor el índice de agallas, y viceversa.

De igual manera, se indica que el análisis de correlación determinó que la variable peso de la raíz presentó una correlación positiva y altamente significativa entre el índice de agallas ($r= 0.26$, $p= 0.0247$). Estos resultados nos indican que a menor índice de agallas mayor será el peso de la raíz.

La acción parasitaria de los hongos nematófagos redujo la población de nematodos y J2 en el suelo, como lo demuestra la disminución del índice de agallas en las raíces, según la correlación biológica entre los niveles de efectividad de *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum* y el desarrollo de las plantas tratadas se obtuvieron resultados similares a los informados por Silva et al. (2017), quienes explican los mecanismos químicos de penetración, que están determinados por la actividad enzimática de tipo hidrolítico como las esterasas, proteasas de tipo serina, quitinasas y lipasas, que digieren la cutícula del huevo y aseguran la efectividad infecciosa. Resultados similares a los publicados por Fatemy (2019) quienes determinaron el parasitismo en huevos al administrar *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* a *M. incognita* en tomate en condiciones de campo, disminuyendo la nodulación de raíces y el número de nematodos en el suelo, y aumentando el rendimiento de los cultivos.

CONCLUSIONES

-*Meloidogyne spp.* fue el género de nematodos fitopatógenos endoparásito más prevalente en suelo dedicado a cultivo de café, seguido de los géneros *Pratylenchus spp.* y *Helicotylenchus spp.* De igual manera se encontraron géneros de ectoparásitos importantes, pero a menor medida como *Xiphinema spp.*, *Tylenchus spp.* y *Rotylenchus spp.*

-Se comprobó la calidad microbiológica de la formulación líquida de las cepas *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* del producto Bioconsorcio Nematicida de Biotechnica S.A. De acuerdo con los resultados, se tiene información sobre la frecuencia de aplicación y concentración del bioformulado para la disminución de las poblaciones de nematodos en condiciones de invernadero, lo cual es útil para la validación de estos resultados en campo.

-La interacción entre los nematodos fitopatógenos con los hongos nematófagos reveló que: *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* ejercen una acción mecánica y enzimática, logrando reducir significativamente las poblaciones de nematodos, destacándose hasta un 80.5% de efectividad, presentando un efecto nematicida alto. Lo que nos indica entonces que estos dos hongos son una alternativa de biocontrol dentro de un plan de manejo integrado de nematodos en cultivos de café (*Coffea arabica*).

- Los análisis de correlación permitieron determinar una relación positiva entre los tratamientos con los hongos nematófagos que presentaron menores índices de agallas, menor población de J2 y nematodos en suelo con los mayores valores de las variables agronómicas y del peso de la raíz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18, 265-267.
- Ahmad, R. Z., Sidi, B. B., Endrawati, D., Ekawasti, F., & Chaerani. (2019). Paecilomyces lilacinus and P.variotii as a predator of nematode and trematode eggs. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 299. doi:10.1088/1755-1315/299/1/012056
- ANACAFE. (2016). Guía de variedades de café. Guatemala.
- Asamizu, E., Shirasawa, K., Hirakawa, H., & Iwahori, H. (2020). Root-knot nematode genetic diversity associated with host compatibility to sweetpotato cultivars. *Molecular Plant Pathology*, 21(8), 1088-1098. doi:10.1111/mpp.12961
- Avelar, T. S., Lopes, E. A., Evans, H. C., & de Freitas, L. G. (2017). Interactions Between Pochonia chlamydosporia and Nematodes. En *Perspectives in Sustainable Nematode Management Through Pochonia chlamydosporia Applications for Root and Rhizosphere Health* (págs. 77-96).
- Avelar, T. S., Magalhães, P. V., Gouveia, A. S., Balbino, H. M., & Grassi de Freitas, L. (2020). Pochonia. En *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (págs. 669-682). doi:10.1016/b978-0-12-823414-3.00033-2
- Bastidas, A., Velázquez, S., Marín, P., Benavides, P., Bustillo, A., & Orozco, F. (2009). Evaluación de preformulados de Beauveria bassiana (bálsamo) Vuillemin, para el control de la broca del café. *Agron*, 17(1), 44-61.
- Becker, J. O., & Westerdahl, B. B. (2018). *UC IPM Pest Management Guidelines: Citrus*. Obtenido de UC ANR Publication 3441.
- Bendezu, C. R. (2017). *CONTROL DE Meloidogyne sp. EN VIVERO DE Coffea arabica L. MEDIANTE QUINOLEÍNA FENOLICA, Paecilomyces lilacinus y ESTIÉRCOL EN LA ZONA DE SATIPO*. Tesis para optar al título profesional de Ingeniero en Ciencias Agrarias, UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DEL PERÚ, FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS.
- Bernard, G. C., Egnin, M., & Bonsi, C. (2017). The Impact of Plant-Parasitic Nematodes on Agriculture and Methods of Control. En *Nematology - Concepts, Diagnosis and Control* (págs. 121-152). Croatia: InTech. doi:10.5772/intechopen.68958

- Bertrand, B., Núñez, C., & Sarah, J. (2000). Disease complex in coffee involving *Meloidogyne arabicida* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*(49), 383-388.
- Bridge, J., & Starr, J. (2019). *Plant nematodes of agricultural importance: a colour handbook*. CRC Press.
- Carpenter, J., Lynch, L., & Trout, T. (2001). *Calif. Agric.*, 55(3), 12-18.
- Carvalho, É., Amora, D., Avelar, T., Soares, P., Silva, G., Ferreira, F., & Grassi, L. (2018). *Pochonia chlamydosporia* applied via seed treatment for nematode control in two soil types. *Crop Protection*, 114, 106-112. doi:10.1016/j.cropro.2018.08.010
- Castellón, J. (2014). *EVALUACIÓN DE POBLACIONES DE FITONEMÁTODOS, NEMATODOS DE VIDA LIBRE EN CULTIVO DE BANANO ASOCIADO CON CAFÉ Y ÁRBOLES EN 7 FINCAS DEL MUNICIPIO DE SAN RAMÓN, DEPARTAMENTO DE MATAGALPA, NICARAGUA, SEPTIEMBRE- DICIEMBRE 2012*. Tesis de maestría, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA – LEON, FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS, Leon.
- Castillo, & Medina. (2014). *Control biológico del nematodo agallador del tomate de mesa meloidogyne incognita (kofoid and white, 1919) chitwood, 1949 mediante aislamientos de hongos nematófagos nativos*. Tesis Ing. Agronómica, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador.
- Castro, J., & Moreira, W. A. (2020). Nematoides. En *Frutas do Brasil*. Uva de Mesa Fitossanidade.
- Chitwood, D. J. (2003). NEMATICIDES. USDA-ARS. doi:10.1002/047126363X.agr171
- Ciobanu, M., Geraert, E., & Popovici, I. (2003). The genus *Tylenchus* Bastian, 1865 in Romania (Nematoda: Tylenchidae). *Nematol. medit.*(31), 46-54.
- Collange, B., Navarrete, M., Peyre, G., Mateille, T., & Tchamitchian, M. (2011). Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. *Crop Prot.*, 30, 1251-1262. doi:10.1016/j.cropro.2011.04.016.
- Coyne, D. L., Nicol, J. M., & Claudius-Cole, B. (2014). *Practical plant nematology: A field and laboratory guide*. (2nd edition ed.). SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA).

- Dahlin, P., Eder, R., Consoli, E., Krauss, J., & Kiewnick, S. (2019). Integrated control of *Meloidogyne incognita* in tomatoes using fluopyram and *Purpureocillium lilacinum* strain 251. *Crop Protection*, *124*, 104-874. doi:10.1016/j.cropro.2019.104874
- Decraemer, W., & Geraert, E. (2013). Ectoparasitic nematodes. En R. N. Perry, *Plant Nematology* (2nd ed.). CAB International.
- Decraemer, W., & Hunt, D. J. (2013). Structure and Classification. En R. N. Perry, & M. Moens, *Plant Nematology* (2nd ed.). CAB International.
- Duncan, L. W., & Moens, M. (2013). Migratory endoparasitic nematodes. En R. N. Perry, & M. Moens, *Plant Nematology* (2nd ed.). CAB International.
- Fatemy, S. (2019). Suppression of *Meloidogyne javanica* on cucumber by *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* compared to biofumigation, soil amendment and solarisation. *Biological Control of Pests & Plant Diseases*, *8*(1), 59-74. doi:10.22059/jbioc.2019.268157.244
- Gallego, J., Cardona, N., & Restrepo, F. (2014). *Compatibilidad del hongo entomopatógeno Purpureocillium sp. Cepa UdeA0106 con biocontroladores y productos fitosanitarios*.
- Goettel, M. S., & Inglis, G. D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. En A. Lacey, Lawrence A. Lacey (Ed.), *manual of techniques in insect pathology (213-147 pp)* (págs. 213-147). Academic Press.
- Gomes, C. R., de Oliveira, L. F., & Ribeiro, C. V. (2017). Methods and Tools Currently Used for the Identification of Plant Parasitic Nematodes. En *Nematology - Concepts, Diagnosis and Control* (págs. 19-35). Croatia: InTech. doi:10.5772/66851
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2014). *MANUAL DE PRODUCCIÓN Y USO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS*. SCB-SENASA.
- Guzmán-Piedrabita, Ó. A. (2011). IMPORTANCIA DE LOS NEMATODOS ESPIRAL, *Helicotylenchus multicinctus* (COBB) GOLDEN Y *H. dihystra* (COBB) SHER., *agron*, *19*(2), 19-32.
- Herrera, I., Bryngelsson, T., & Monzón, A. (2011). Occurrence of *Meloidogyne* sp. and *Pratylenchus* sp. in conventional. *Nematropica*, *41*, 82-90.

- Herrera, S. I. (2011). *Root-Knot Nematodes and Coffee in Nicaragua: Management Systems, Species Identification and Genetic Diversity*. Tesis doctoral, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Alnarp.
- Humber, R. A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. En *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. USDA-ARS.
- Humber, R. A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. En USDA-ARS, *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*.
- Hunt, D. J., Palomares-Rius, J. E., & Manzanilla-López, R. H. (2018). Identification, Morphology and Biology of Plant Parasitic Nematodes. En *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture* (3ra ed., págs. 20-61). Boston: CABI.
- Hussey, R., & Barker, K. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57, 1025-1028.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., . . . Perry, R. N. (2013, Julio 1). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946-961. doi:10.1111/mpp.12057
- Jones, R. K. (2017). Nematode Control and Nematicides: Developments Since 1982 and Future Trends. En *Nematology in South Africa: A View from* (págs. 129-150). Switzerland: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-44210-5_6
- Karssen, G., Wesemael, W., & Moens, M. (2013). Root-knot nematodes. En R. N. Perry, & M. Moens, *Plant Nematology* (2nd ed.). CAB International.
- Kumar, A., Patil, J., Yadav, S., & Verma, K. (2020). Response of Organic Amendment and Bio-agents Against Root-knot Nematode, *Meloidogyne incognita* Infesting Cluster Bean. *Plant Pathology Journal*, 19, 221-225. doi:10.3923/ppj.2020.221.225
- Leandro, H. J. (2017). *Pochonia chlamydosporia - Biological control agent of root-knot and potato cyst nematodes*. Tesis Maestría, Universidade de Coimbra, Departamento de Ciências da Vida.
- León, I. R. (2019). *PROSPECCIÓN Y SELECCIÓN DE AISLADOS DE Trichoderma spp. Y Pochonia spp. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO AGALLADOR*

- DE TOMATE EN CONDICIONES IN VITRO E INVERNADERO*. Tesis Ing. Agronómica, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador.
- MAGFOR, CONACAFE, IICA. (2008). “Programa de Reconversión y Diversificación Competitiva de la Caficultura Nicaragüense y Seguridad Alimentaria.
- Maherali, H., & Klironomos, J. N. (2007). Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science*, 1746-1748.
- Manzanilla-López, R. H., & Lopez-Llorca, L. V. (Edits.). (2017). *Perspectives in Sustainable Nematode Management Through Pochonia chlamydosporia Applications for Root and Rhizosphere Health*. doi:10.1007/978-3-319-59224-4
- Martínez, Y., & Suárez, Z. (2013). Compatibilidad de *Trichoderma harzianum* con *Paecilomyces lilacinus* y *Paecilomyces fumosoroseus* en condiciones in vitro. En *Investigaciones*.
- Matus, M. M., & Jiménez-Martínez, E. (2020). Evaluación de plaguicidas para el manejo de plagas del café *Coffea arabica* L. en Jinotega, Nicaragua. *La Calera*, 20-28. doi: /10.5377/calera.v20i34.9668
- Mekete, T., Dababat, A., Sekora, N., Akyazi, F., & Abebe, E. (2012). *Identification key for agriculturally important plant-parasitic nematodes Prepared for the International Nematode Diagnosis and Identification Course 2012 - A manual for nematology*. D.F., Mexico: CIMMYT.
- Mesa-Valle, C. M., Garrido-Cardenas, J. A., Cebrian-Carmona, J., Talavera, M., & Manzano-Agugliaro, F. (2020). Global Research on Plant Nematodes. *Agronomy*, 10(8), 11-48. Doi: 10.3390/agronomy10081148
- Monzón, A., Herrera, I., & Méndez, E. (2009). Uso y manejo de *Paecilomyces lilacinus* para el. Obtenido de file:///C:/Users/Agrar%20Ingenieria/Downloads/Guia%20Uso%20y%20manejo%20p aeci
- Moreno-Gavíra, A., Huertas, V., Diánez, F., Sánchez-Montesinos, B., & Santos, M. (2020). *Paecilomyces* and Its Importance in the Biological Control of Agricultural Pests and Diseases. *Plants*, 9, 17-46. doi:10.3390/plants9121746

- Nyaku, S. T., Affokpon, A., Danquah, A., & Brentu, F. C. (2017). Harnessing Useful Rhizosphere Microorganisms for Nematode Control. En *Nematology - Concepts, Diagnosis and Control* (págs. 153-182). InTech. doi:10.5772/intechopen.69164
- Orlando, V., Grove, I., Edwards, S., Prior, T., Roberts, D., Neilson, R., & Back, M. (2020). Root-lesion nematodes of potato: current status of diagnostics, pathogenicity and management. *Plant Pathology*, 13-144. doi:10.1111/ppa.13144
- Pavone, D. (2012). *Biocontrol de Rhizoctonia solani Kühn por Trichoderma spp.* Tesis Doctoral, Universidad Central de Venezuela.
- Pérez, G. D. (2019). *Uso de enmiendas orgánicas y productos biológicos para el manejo de nematodos fitoparásitos, en dos fincas cafetaleras en Jinotega, 2014.* Trabajo de Graduación, Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía, Managua.
- Perry, R. N., & Moens, M. (Edits.). (2013). *Plant Nematology* (2nd Edition ed.). CAB International.
- Ravichandra, N. G. (2014). *Horticultural Nematology*. Springer India. doi:10.1007/978-81-322-1841-8
- Rivas, C. (2008). *El Café en Nicaragua*. Obtenido de <http://www.monografias.com/trabajos-pdf/cafe-nicaragua/cafe-nicaragua.pdf>
- Sangama, M. (2016). *CONTROL DE NEMÁTODOS EN SACHA INCHI (Plukenetia volubilis L.) CON EL HONGO NEMATÓFAGO Pochonia chlamydosporia EN SAN MARTÍN – PERÚ*. Tesis de grado, UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO, DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL, Tarapoto.
- Sarven, M. S., Aminuzzaman, F. M., & Huq, M. E. (2019). Dose-response relations between *Purpureocillium lilacinum* PLSAU-1 and *Meloidogyne incognita* infecting brinjal plant on plant growth and nematode management: a greenhouse stud. *Egypt J Biol Pest Control*, 29(26). doi: 10.1186/s41938-019-0128-6
- Senthilkumar, M., Anandham, R., & Krishnamoorthy, R. (2020). Paecilomyces. En *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (págs. 793-808). doi:10.1016/b978-0-12-823414-3.00041-1

- Sikora, R. A., & Roberts, P. A. (2018). Management Practices: An Overview of Integrated Nematode Management Technologies. En *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture* (3ra ed., págs. 795-838). CAB International.
- Siles, G. P. (2001). *Comportamiento fisiológico del café asociado con Eucalyptus deglupta, Terminalia iverensis y sin sombra*. Turrialba: CATIE.
- Silva, S., Carneiro, R., Faria, M., Souza, D., Monnerat, R., & Lopes, R. (2017). Evaluation of Pochonia chlamydosporia and Purpureocillium lilacinum for Suppression of Meloidogyne enterolobii on Tomato and Banana. *Journal of nematology*, 49(1), 77-85. doi:10.21307/jofnem-2017-047
- Storey, S. G., Malan, A. P., & Hugo, H. J. (2017). Nematode Pests of Grapevine. En *Nematology in South Africa: A View from the 21st Century* (págs. 325-344). Switzerland: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-44210-5
- Villain, L., Baujard, P., Anzueto, A., Hernández, & Sahara, J. (2002). Integrated protection of coffee planting in Central América against nematodes. Plante recherche developpment. . En *Research and coffee growing* (págs. 118-133).
- Vinces, V. E. (2019). *SELECCIÓN DE AISLADOS NATIVOS DE Purpureocillium spp Y MATERIALES ORGÁNICOS EN EL CONTROL DEL NEMATODO Meloidogyne incognita (Kofoid & White) Chitwood EN TOMATE*. Tesis de grado.
- Whitehead, A. G., & Hemming, J. R. (1965). A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology*, 55(1), 25-38. doi: 10.1111/j.1744-7348.1965.tb07864.x
- Zhang, K., & Hyde, K. (2014). *Nematode-Trapping Fungi* (Vol. 23). doi:10.1007/978-94-017-8730-7

ANEXOS

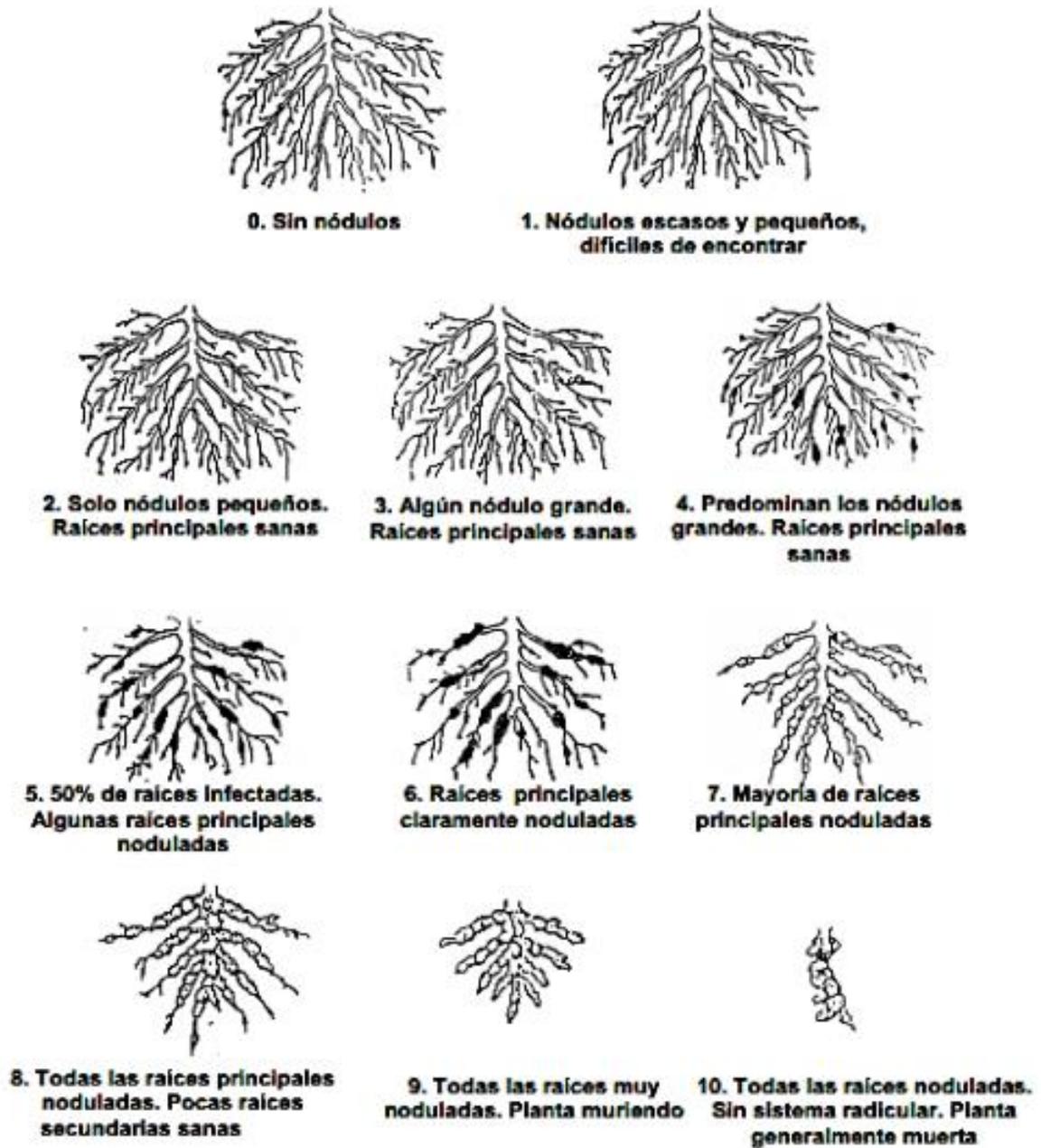
Anexo 1. Ficha de Recolección de Datos

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA UNAN - MANAGUA</p>		<p>Instituto Politécnico de la Salud "Luis Felipe Moncada" Departamento de Bioanálisis Clínico Licenciatura en Microbiología</p>			
FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS					
I. DATOS GENERALES					
FECHA DE MUESTREO		/ /		UBICACIÓN	
NUMERO DE MUESTRA				TRATAMIENTO	
PESO NETO					
II. VARIEDAD DE CAFÉ					
1. GENERO Y ESPECIE					
III. IDENTIFICACIÓN DE NEMATODOS					
2. GENERO		<i>Meloidogyne spp.</i> <input type="checkbox"/> <i>Pratylenchus spp.</i> <input type="checkbox"/> <i>Helicotylenchus spp.</i> <input type="checkbox"/>		<i>Xiphinema spp.</i> <input type="checkbox"/> <i>Hemicriconemoides spp.</i> <input type="checkbox"/> <i>Radopholus spp.</i> <input type="checkbox"/> <i>Rotylenchulus spp.</i> <input type="checkbox"/>	
3. FASE DE ESTADIO		Adultos		Jóvenes	
				Huevos	
III. DENSIDAD POBLACIONAL DE NEMATODOS					
4. DENSIDAD EN SUELO			5. DENSIDAD EN RAIZ		
Numero de nematos/250 o 500 cm3				Numero de nematodos/g de raíz	
IV. EVALUACION DE POCHONIA CHLAMYDOSPORIA Y PURPUREOCILLIUM LILACINUM					
6. COLONIZACIÓN DE RAÍCES			7. PARASITISMO DE HUEVOS		
<i>Pochonia chlamydosporia</i>		<i>Purpureocillium lilacinum</i>		Presencia <input type="checkbox"/>	
Presencia <input type="checkbox"/>		Presencia <input type="checkbox"/>		Ausencia <input type="checkbox"/>	
Ausencia <input type="checkbox"/>		Ausencia <input type="checkbox"/>		Cantidad:	
Cantidad:		Cantidad:			
V. EVALUACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS PLANTAS					
8. LONGITUD DE LA PLANTA					
9. PESO DE LA PARTE AÉREA					
10. PESO FRESCO DE LAS RAÍCES		Raíces sanas:		Raíces afectadas:	
11. NÚMERO DE FLORES					
12. PH DE LAS ÁREAS TRATADAS					

Anexo 2. Cronograma de Trabajo

TAREAS	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Abr
Fase 1: Planificación																
Selección del tema	■															
Justificación, objetivos	■															
Marco teórico		■														
Diseño metodológico			■													
Entrega del protocolo al departamento			■													
Fase 2: Campo/Laboratorio																
Aplicación de tratamiento								■								
Muestreos								■	■	■	■	■	■	■		
Análisis de resultados								■	■	■	■	■	■	■	■	
Fase 2: Divulgación																
Elaboración de informe de investigación															■	■
Entrega al departamento															■	
Defensa																■

Anexo 3. Escala de evaluación de índice de agallas para el nematodo agallador (Escala de Bridge y Page, 1980).



Anexo 4. Tabla De Resumen De Datos Obtenidos Por Muestreo

Tratamientos	Nematologia		Micologia		VAST		Valoracion fisiologica		
	Nematodos/ 100 g	% reduccion / testigo	P. chlamydospori a	P. lilacinum	%	CV%	Peso Total	Peso Raices	Peso foliar
MUESTREO PREVIO									
LINEA DE BAS	444		0.00E+00		14%	28%	n/a	n/a	n/a
PRIMER MUESTREO 15 DDA									
TESTIGO	126.0	0.0	0.00E+00		14%	28%	6g	1.3g	4.3g
MITAD	105	16.7			12%	0%	8g	1.8g	5.2g
NORMAL	60	52.4			22%	62%	5.4g	1.1g	3.8g
DOBLE	28	77.8			14%	28%	7.2g	1.6g	4.4g
SEGUNDO MUESTREO 30 DDA									
TESTIGO	80	0.0	1.00E+02		20%	86%	9g	1.9g	5.9g
MITAD	135	-68.8	1.00E+03	1.00E+03	22%	62%	10.5g	2.3g	7.8g
NORMAL	48	40.0	5.00E+03	4.00E+03	20%	86%	7.1g	1.5g	4.9g
DOBLE	32	60.0	7.00E+04	3.00E+03	20%	86%	9.4g	1.9g	7.1g
TERCER MUESTREO 45 DDA									
TESTIGO	42	0.0	1.00E+03		20%	86%	9g	1.9g	5.9g
MITAD	56	-33.3			22%	62%	10.5g	2.3g	7.8g
NORMAL	15	64.3			22%	62%	7.1g	1.5g	4.9g
DOBLE	56	-33.3			20%	86%	9.4g	1.9g	7.1g
CUARTO MUESTREO 60 DDA									
TESTIGO	30	0.0			20%	86%	9g	1.9g	5.9g
MITAD	30	0.0			22%	62%	10.5g	2.3g	7.8g
NORMAL	75	-150.0			22%	62%	7.1g	1.5g	4.9g
DOBLE	30	0.0			20%	86%	9.4g	1.9g	7.1g
QUINTO MUESTREO 75 DDA									
TESTIGO	133	0.0			20%	86%	9g	1.9g	5.9g
MITAD	28	78.9			22%	62%	10.5g	2.3g	7.8g
NORMAL	70	47.4			22%	62%	7.1g	1.5g	4.9g
DOBLE	42	68.4			20%	86%	9.4g	1.9g	7.1g
SEXTO MUESTREO 95 DDA									
TESTIGO	128	0.0			20%	86%	9g	1.9g	5.9g
MITAD	25	80.5			22%	62%	10.5g	2.3g	7.8g
NORMAL	60	53.1			22%	62%	7.1g	1.5g	4.9g
DOBLE	30	76.6			20%	86%	9.4g	1.9g	7.1g

Anexo 5. Tabla De Contabilización De Nematodos Fitopatógenos Según Genero Y Tiempo De Muestreo

DSA	CODIGO	Meloidogyne	Pratylenchus	Rotylenchus	Tylenchus	Helicotylenchus	Xiphinema	Total						
LN	333	10	56	42										
15	T1-M1	42	33.33	28	22.22	14	11.11	0.00	42	33.33	0.00	126		
15	T2-M1	60	57.14	30	28.57		0.00	0.00	15	14.29	0.00	105		
15	T3-M1	30	50.00	15	25.00		0.00	0.00	15	25.00	0.00	60		
15	T4-M1	14	50.00		0.00		0.00	0.00		0.00	14	50.00	28	
30	T1-M2	16	20.00	32	40.00		0.00	16	20.00	0.00	16	20.00	80	
30	T2-M2	15	12.50	45	37.50		0.00	30	25.00	15	12.50	15	12.50	120
30	T3-M2	16	33.33	16	33.33		0.00	0.00	0.00	0.00	16	33.33	48	
30	T4-M2	16	50.00		0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	16	50.00	32	
45	T2-M3	28	50.00		0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	28	50.00	56	
45	T3-M3	15	100.00		0.00		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	15	
45	T4-M3		0.00	28	50.00		0.00	0.00	28	50.00		0.00	56	
60	T1-M4		0.00		0.00		0.00	15	50.00	0.00	15	50.00	30	
60	T2-M4	15	50.00		0.00		0.00	0.00	15	50.00		0.00	30	
60	T3-M4	15	20.00	15	20.00		0.00	15	20.00	0.00	30	40.00	75	
60	T4-M4	15	50.00	15	50.00		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	30	
75	T1-M5	28	21.05	35	26.32	14	10.53		0.00	14	10.53	42	31.58	133
75	T2-M5		0.00		0.00		0.00	14	50.00		0.00	14	50.00	28
75	T3-M5	14	20.00	14	20.00		0.00	14	20.00	14	20.00	14	20.00	70
75	T4-M5		0.00		0.00	14	33.33	14	33.33	14	33.33		0.00	42
90	T1-M6	28	21.88	28	21.88	14	10.94	21	16.41	22	17.19	15	11.72	128
90	T2-M6	10	40.00		0.00		0.00	15	60.00		0.00		0.00	25
90	T3-M6	30	50.00	15	25.00		0.00	0.00	15	25.00		0.00	60	
90	T4-M6	15	50.00	15	50.00		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	30	
totales		700	49.75	311	22.10	14	1.00	210	14.93	236	16.77	235	16.70	1407

Anexo 6. Variables Agronómicas De Las Plantas De Café En Estudio

LONGITUD			
T1	T2	T3	T4
14	20.5	12	17
11	17	11	16.5
15	16	14	16
16	13	16	12
16.5	17.5	12	14
10	12	10.5	16
23	18	10	12
12.5	11	10	14
16	13	10.5	13
14	11	17	14
14	16	20	14
12	13	10	19
16	22	15	17
15	28	17	14
24	14	17	20
15	27	18	13
20	12.5	13	17
15	9	17	19
12	15,5	12.5	20
16	10	15	25
25	13	16	17
21	16	20	24
15	18	23	22
16	21	18	20
10	19	22	12
11	24	14	21
15	22	19	24
15	24	15	21
21	26	7	23
19	26	14	26
18	12	12	22
15.5	15	21	19
23	14	22	21
16	17	27	27
20	24	31	21
23	28	27	27
24	17	27	33
28	27	30	24
22	28	23	30
30	34	30	35
26	29	22	30
21	31	27	24
37	39	36	32
33	30	33	32
36	32	34	33
26	37	22	30
36	32	33	31
30	19	24	32
33	30	30	32
30	28	29	22
48	42	35	36
46	40	43	49
39	42	52	42
40	42	40	52
36	46	43	49
49	46	39	50
36	33	48	44
43	34	42	46
32	47	44	41
41	47	35	52
36	54	52	46
40	47	47	51
50	56	53	35
46	54	40	41
40	48	50	29
40	45	37	50
40	40	48	53
30	37	34	49
33	41	59	44
25	27	42	52

PESO PLANTA				
T1	T2	T3	T4	
6	8	5.4	7.2	
9	10.5	7.1	9.4	
10.4	12.4	8.7	12.4	
16.9	17.4	20.08	21.1	
45.1	42.8	30	30	
73.8	77.8	90.3	91.1	
67.8	71.7	106	91.4	

PESO AEREO				
T1	T2	T3	T4	
4.3	5.2	3.8	4.4	
5.9	7.8	4.9	7.1	
7.4	9.3	6.5	9	
61.1	64.9	71.6	71.9	
53.1	66	86.5	70	

PESO RAIZ				
T1	T2	T3	T4	
1.3	1.8	1.1	1.6	
1.9	2.3	1.5	1.9	
1.3	3.4	1.7	2.5	
23.5	20.2	28.3	25.5	
20.5	27.9	37.2	29.1	

Anexo 7. Variables Nematodos/g de suelo, J2/g de suelo y PF-PI

Variable depe: Nematodos / g suelo

Tratamientos	Media	Desviación estándar	N
T1 (Testigo)	82.2000	47.02340	5
T2 (Media Dosis)	70.8000	47.45208	5
T3 (Dosis Normal)	53.6000	23.92279	5
T4 (Doble Dosis)	37.6000	11.61034	5
Total	61.0500	37.28902	20

Variable depe: Juveniles / g suelo

Tratamientos	Media	Desviación estándar	N
T1 (Testigo)	64.2000	39.30903	5
T2 (Media Dosis)	44.2000	30.51557	5
T3 (Dosis Normal)	41.8000	18.89974	5
T4 (Doble Dosis)	32.0000	5.83095	5
Total	45.5500	27.34473	20

Variable depe: PI_PF

Tratamientos	Media	Desviación estándar	N
T1 (Testigo)	1.8450	.30406	2
T2 (Media Dosis)	.4000	.18385	2
T3 (Dosis Normal)	1.9850	.26163	2
T4 (Doble Dosis)	.2750	.03536	2
Total	.6263	.35821	8

Anexo 8. Preparación invernadero

Figura 15

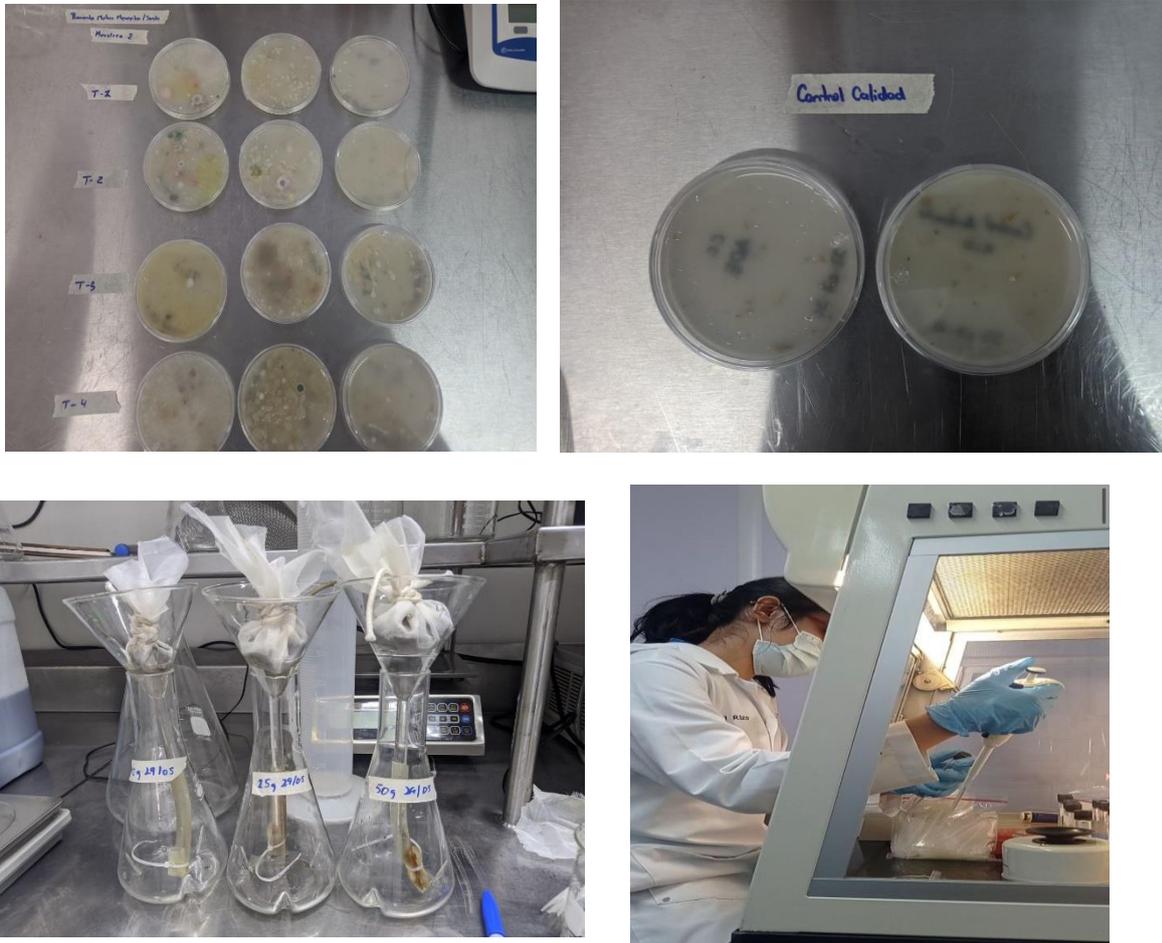
Preparación, muestreo y aplicación de invernaderos controlada por investigadores IPSA.



Anexo 9. Montaje y cultivo de muestras de suelo

Figura 16

Montaje, preparación de diluciones seriadas y método de extracción por embudo de Bermann en muestras de suelo.



Anexo 10. Nematodos fitopatógenos

Figura 17

Géneros de nematodos fitopatógenos

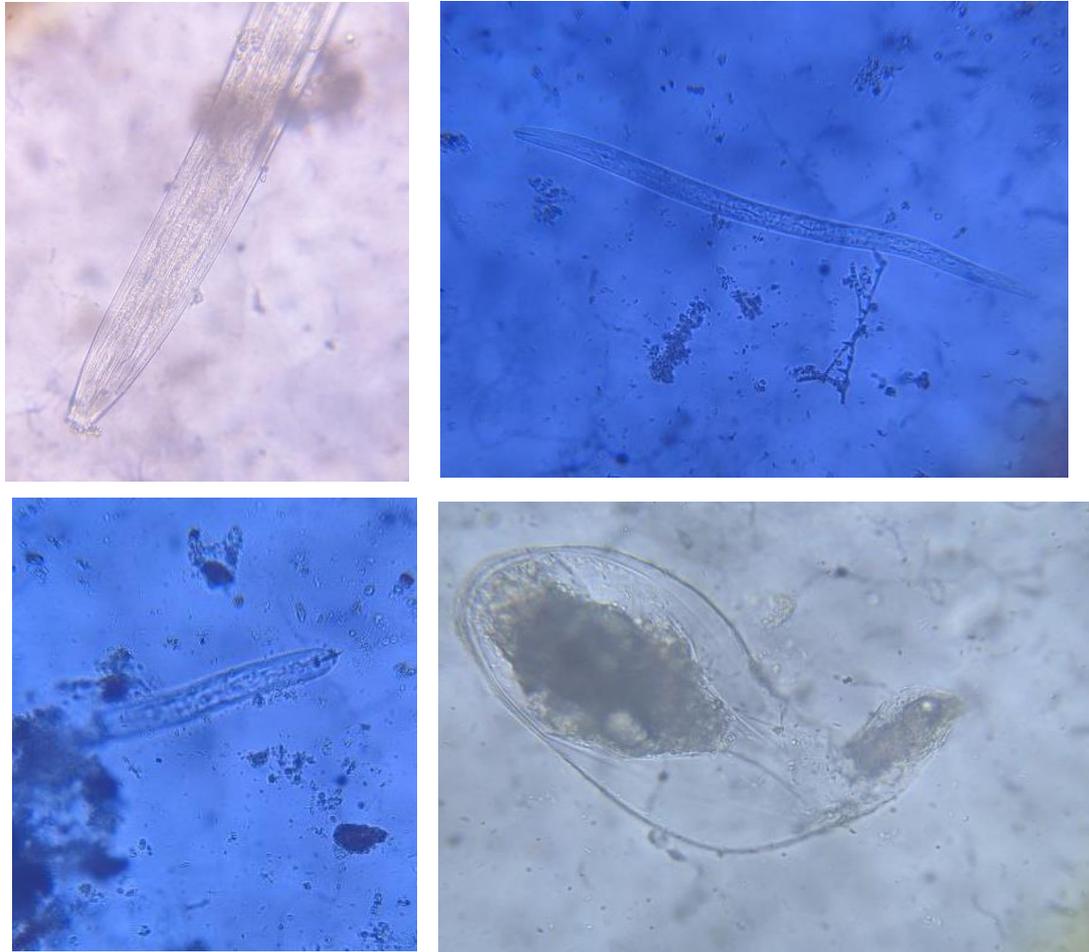
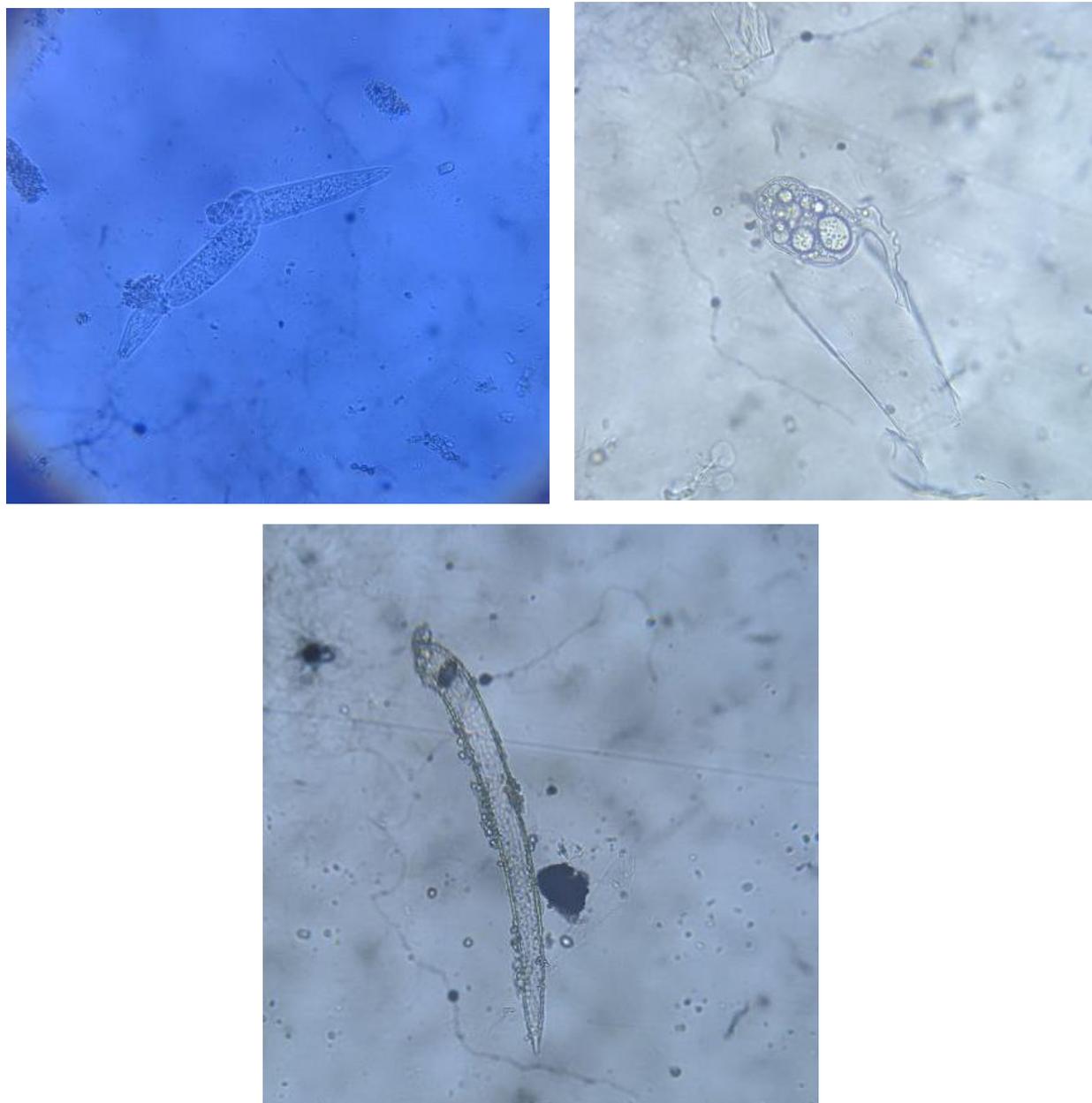


Figura 18

Nematodos y huevos infectados por hongos nematófagos



Anexo 11. Nematodos fitopatógenos

Figura 19

Plantas de café al inicio y al final del estudio



Tratamientos: De izquierda a derecha: T1, T2, T3 y T4