



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**ESCUELA DE INGENIERIA AGRONÓMICA**

**AISLAMIENTO DE HONGOS NATIVOS PARA EL MANEJO DE  
NEMATODOS FITOPARÁSITOS DE LA RIZOSFERA DEL TOMATE RIÑÓN  
(*Lycopersicum sculentum* L.)**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

**JHONNY FERNANDO GUAMINGA VALENTE**

**RIOBAMBA-ECUADOR**

**2016**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

El suscrito **TRIBUNAL DEL TRABAJO DE TITULACIÓN, CERTIFICA QUE:** el trabajo de investigación titulado: **“AISLAMIENTO DE HONGOS NATIVOS PARA EL MANEJO DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS DE LA RIZOSFERA DEL TOMATE RIÑÓN (*Lycopersicon esculentum* L.)”**, de responsabilidad del Sr. Egresado Jhonny Fernando Guaminga Valente ha sido prolijamente revisada quedando autorizada su presentación.

---

**ING. NORMA ERAZO.**  
**DIRECTORA**

---

**ING. CARLOS CARPIO.**  
**ASESOR**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2016**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jhonny Fernando Guaminga Valente, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes y el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 22 de julio del 2016

Jhonny Fernando Guaminga Valente

0604123075

## **DEDICATORIA**

A Dios porque es la fuerza que me levanta cuando creo que no puedo continuar.

A mis padres y a mi hermano que con su amor y dedicación nunca dejaron de creer en mí y con sus esfuerzos me ayudaron a seguir adelante.

A los seres que Dios puso en mi vida y conforman mi hogar mi hijo Matías Guaminga y mi novia Cristina Lema por llenarme el corazón de alegrías y darme el empujón para esforzarme en la culminación de la carrera.

**Jhonny Guaminga**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios, a mis padres, en especial a mi madre; que con su apoyo ha sabido guiarme por el camino del bien, y así poder culminar una etapa más de mi vida, además de ser pilar fundamentales para este logro.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, que cumple con su misión principal, Formar profesionales e investigadores competentes, a todos y cada uno de los docentes, que compartieron sus conocimientos y experiencias que en nuestra trayectoria de estudiante nos han ilustrado y a la vez inculcar en nosotros la formación de la ética profesional.

De la misma manera agradezco al Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales, que dio la apertura para la realización del presente trabajo de investigación.

A la Ing. Norma Erazo Msc, en calidad de la Directora del Trabajo de Titulación que con sus virtudes profesionales y humanas hicieron posible la investigación científica hasta culminar el presente informe.

Al Ing. Carlos Carpio Msc., en calidad de Asesor del Trabajo de Titulación que con sus acertadas observaciones y recomendación me ayudan a encaminar el Trabajo de Titulación.

**TABLA DE CONTENIDOS**

LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ANEXOS	ix
I. TITULO	1
II. INTRODUCCION	1
III. REVISIÓN DE LITERATURA	5
IV. MATERIALES Y METODOS	21
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
VI. CONCLUSIONES	42
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. RESUMEN	44
IX. SUMMARY	45
X. BIBLIOGRAFÍA	46
XI. ANEXOS	52

## LISTA DE CUADROS

1. Muestreo para la determinación de la densidad poblacional de nematodos	27
2. Distribución de los tratamientos	28
3. Esquema del diseño experimental	28
4. Densidad poblacional de nematodos fitoparásitos de la rizósfera del tomate riñón	31
5. Densidad población de <i>Meloidogyne</i>	32
6. Caracterización de las muestras de suelo	34
7. Unidades formadoras de colonias (ufc) dilución $10^{-3}$	35
8. Número de colonias aisladas por cada muestra de suelo	36
9. Cepas seleccionadas para pruebas invitro	37
10. Análisis de varianza para el porcentaje de nematodos inactivos por tratamiento	38
11. Prueba de Tukey al 5% para el factor tratamiento. T0= Testigo, T1= <i>Trichoderma</i> 1, T2= Sin identificar, T3= <i>Cladophialophora</i> , T4= <i>Aspergillum</i> , T5= <i>Fusarium</i> 1; T6= <i>Paecilomyces</i> ; T7= <i>Acremonium</i> , T8= <i>Trichoderma</i> 2, T9 = <i>Fusarium</i> 2.	39

## LISTA DE FIGURAS

1. Aspecto de órganos de captura de hongos nematófagos nematodos	18
2. Ubicación geográfica de las áreas muestreadas para la determinación de la densidad poblacional de nematodos fitoparásitos	30
3. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo para el aislamiento de hongos nativo	33
4. Unidades formadoras de colonias (ufc/mL) dilución 10-3	35
5. Porcentaje Nematodos inactivos por tratamiento	39
6. Observación microscopica (40X) <i>Trichoderma</i>	40
7. Observación microscopica (40X) <i>Paecilomyces</i>	41
8. Observacion microscopica (10X) <i>Acremonium</i>	41



**LISTA DE ANEXOS**

1. Medios de cultivo	52
2. Microorganismos aislados del suelo	53
3. Incidencia y severidad de <i>Meloidogyne incognita</i>	67
4. Agroquímicos de uso común en la parroquia san Luis	68
5. Análisis no paramétrico mediante prueba de Kruskal Wallis	70
6. Comparación de apares para selección de las mejores cepas	71
7. Datos porcentuales de nematodos con y sin actividad	72
8. Datos transformados (Bliss) para análisis de varianza ADEVA	74

**I. AISLAMIENTO DE HONGOS NATIVOS PARA EL MANEJO DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS DE LA RIZOSFERA DEL TOMATE RIÑÓN (*Lycopersicum sculentum L.*)**

**II. INTRODUCCION**

El tomate riñón (*Lycopersicum sculentum L.*) es un cultivo de importancia económica para el país, el área cultivada corresponde a 2972 Ha. El 81,15% del total de la superficie cultiva con tomate riñón se ubican en la región sierra, existiendo 496 Ha. en la provincia de Chimborazo. (INEC, 2014)

La parroquia rural San Luis perteneciente al cantón Riobamba Provincia de Chimborazo, es mayoritariamente agrícola ya que dedica gran parte de su superficie a esta actividad, de acuerdo al Plan de Ordenamiento Territorial el tomate riñón ocupa el segundo lugar en superficie cultiva con 450,26 Ha, lo que vislumbra la importancia del cultivo en la generación de ingresos para sus habitantes. Sin embargo el manejo intensivo del cultivo, mediante el uso de diferentes productos de síntesis química tales como Carbofuran, Carbosulfan, Chlorpyrifos, etc. que por su amplio espectro de acción causan una drástica alteración en el equilibrio microbiológico del suelo, los cuales a pesar de exhibir varios grados de especificidad hacia patógenos de plantas en el suelo; su acción rara vez se limita al patógeno. El efecto completo es la esterilización parcial, causando cambios cualitativos y cuantitativos de la microflora del suelo pudiendo verse gravemente afectados por largos periodos. (AGRONEGOCIOS, s.f)

Entre los organismos habitantes del suelo se encuentran los nematodos, animales invertebrados constituidos por una amplia gama de especies. Se los ha ubicado dentro de cuatro grandes grupos tróficos. I) Micróvoros, que se alimentan de bacterias (bacterívoros) y hongos (fungívoros), II) Herbívoros, que se alimentan de las raíces de las plantas (aunque algunas especies parasitan tallos y hojas); III Omnívoros y IV predadores, que se

alimentan de otros organismos edáficos (incluidos otros nematodos) y pueden ser importantes en la supresión de especies plaga o invasoras. (Campos-Herrera et al. 2008).

Dentro del campo agrícola, las especies fitoparásitos merecen especial atención, y aunque ellos corresponden a un grupo pequeño, alrededor del 4%, se estima que reducen la producción agrícola mundial entre un 12% y un 20%. (Talavera, 2003). *Meloidogyne* spp. es la especie más diseminada y abundante en el Ecuador, es considerada una especie cosmopolita, establecida tanto en ambientes tropicales como templados. Según INIAP (2003) y Eguiguren y Défaz (1992), en Ecuador los nematodos causan pérdidas de 60% y 75%, respectivamente, bajo condiciones de invernadero.

Para el control de estas plagas, se suelen aplicar pesticidas peligrosos de síntesis química, que ponen en riesgo la salud de productores, consumidores y medio ambiente (Roman, J.; Acosta, N. 1984), por ello, se requiere nuevas estrategias de control, tales como el uso de organismos antagonistas, solos o en combinación (Agnenin 2011, Khan et ál. 2011, Soto-Barrientos et ál. 2011).

Entre los antagonistas de nematodos, se menciona a más de 200 especies de hongos descritos alrededor del mundo, los cuales presentan un alto potencial como controladores biológicos (Kerry 2000). De acuerdo con su estrategia de captura, estos hongos se dividen en predadores o atrapa nematodos, endoparásitos (Barrón 1977), parásitos de huevos y hembras y productores de toxinas (Li et ál. 2000). Con el propósito de contar con alternativas para el manejo de nematodos fitoparásitos del cultivo tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) se realizó una colección de aislamientos de hongos nativos procedentes de su rizosfera.

## A. JUSTIFICACIÓN

En Ecuador el cultivo de tomate riñón es de importancia agrícola ya que ocupa el cuarto lugar por área sembrada dentro del cultivo de hortalizas, siendo una fuente de trabajo e ingresos para los productores.

Este cultivo se ha visto afectado por diferentes problemas que disminuyen el rendimiento del cultivo lo que se refleja en los ingresos para el agricultor, el nematodo agallador (*Meloidogyne spp.* y *Nacobbus spp.*) es uno de los principales problemas debido a sus efectos directos e indirectos sobre el cultivo, densidad poblacional y su distribución en todos los estratos geográficos.

A manera de ejemplo en la provincia de Imbabura el 87% de campos muestreados (31 campos y 22 invernaderos) se encuentran infestadas con la especie *M. incognita* con niveles de población baja (1 a 40 Nematodos/100 g de suelo), moderada (41 a 120 Nematodos/100 g de suelo), alta (121 a 150 Nematodos/100 g de suelo) y muy alta (> a 150 Nematodos/100 g de suelo) lo que indica la incidencia y severidad de esta plaga. (Revelo, 2006).

Los nematodos agalladores causan pérdidas económicas importantes, de estas el género *Meloidogyne* es el de mayor relevancia en cultivos hortícolas, Revelo (2006) estima que en tomate riñón se pueden llegar a producir pérdidas de 24-33%.

De manera generalizada se usan nematicidas de síntesis química para su control, aunque su uso se ha visto limitado por sus altos costos, sumado a ello los efectos negativos que pueden llegar a producir tales como provocar destrucción de enemigos naturales, contaminación de aguas subterráneas, resurgimiento de las poblaciones tratadas, posibles efectos sobre la del hombre y el medio ambiente. Es por ello que se deben buscar alternativas biológicas para establecer un programa de manejo integrado del cultivo.

## **B. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo General.**

- a. Obtener aislamientos de hongos para el manejo de nematodos fitoparásitos de la rizosfera de tomate (*Lycopersicum sculentum L.*)

### **2. Objetivos Específicos.**

- a. Aislar hongos del suelo con potencial nematófago procedentes de 5 agro ecosistemas.
- b. Evaluar la patogenicidad y virulencia de los aislamientos seleccionados.

## **C. HIPÓTESIS**

### **1. Nula**

Ninguno de los aislamientos obtenidos de las muestras de suelo es capaz infectar y matar nematodos.

### **2. Alternante**

Al menos uno de los aislamientos obtenidos de las muestras de suelo es capaz infectar y matar nematodos.

### **3. Problema**

Ausencia de una colección de hongos nativos para el manejo de nematodos fitoparásitos de la rizosfera de tomate (*Lycopersicum sculentum L.*) en la Provincia Chimborazo.

### **III. REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **A. NEMATODOS FITOPARÁSITOS**

Existen nematodos tanto de vida libre como parásitos. Se conocen 26.646 especies de nematodos, distribuidas entre especies de vida libre (10.681); parásitos de invertebrados (3.501), de vertebrados (8.359) y de plantas (4.105) (Hugot *et al.*, 2001).

En general, los nematodos fitoparásitos causan pérdidas anuales entre 11 y 14% en cultivos de importancia económica como leguminosas, granos, banano, yuca, coco, remolacha azucarera, caña de azúcar, papa, hortalizas y varios frutales, equivalentes a US\$80 billones/año (Agris, 2005).

Los nematodos fitoparásitos, según el género, tienen en la región anterior (cabeza) un estilete hueco (estomatoestilete u odontoestilete) también llamado “lanza”, pero hay algunos con estilete sólido modificado (onquioestilete). El estilete es usado para penetrar las células de las plantas y a través de él extraer los nutrientes. (Maggenti, Perry y Moens, 2006).

#### **1. Nematodos fitoparásitos del sistema radical**

De acuerdo a Guzmán, O., Zapata, J. y Estrada, B. (2012) los nematodos fitoparásitos del sistema radical se clasifican en:

**1.1. Ectoparásitos.** Son los nematodos que se alimentan sin penetrar a las raíces. En general, los ectoparásitos son de mayor tamaño y con estiletes más largos que los endoparásitos.

Los **ectoparásitos migratorios:**

- Tienen un estilete generalmente largo.
- Se alimentan manteniendo el cuerpo fuera del tejido.
- Ponen los huevos individualmente en el suelo o en la rizósfera.
- Se alimentan de células corticales.
- Establecen relaciones parasíticas especializadas en algunos casos.

- Todos sus estados de desarrollo son parasíticos; como ejemplos de este grupo, están los géneros: *Hemicriconemoides*, *Longidorus*, *Trichodorus*, *Paratrichodorus*, *Belonolaimus*, *Criconemella*, *Xiphinema*, *Paratylenchus*, entre otros.

Los **ectoparásitos sedentarios**:

- Tienen un cuerpo generalmente grueso y en forma de salchicha.
- Se alimentan por largo tiempo de una célula.
- Ponen los huevos dispersos en el suelo.
- Como los ectoparásitos migratorios, todos sus estados de desarrollo son parasíticos.
- Como ejemplos representativos, están los géneros *Criconemella* y *Criconema*.

**1.2. Endoparásitos.** Son los nematodos que penetran completamente dentro de las raíces; por consiguiente, se alimentan, se desarrollan y ponen los huevos en su interior o adheridos a ellas.

Los **endoparásitos sedentarios**, se caracterizan por tener un estilete pequeño y delicado; las hembras inmaduras y juveniles entran al tejido de la planta donde desarrollan un sitio de alimentación fijo e inducen la formación de un sofisticado sistema trófico de células de abrigo (cuidar, criar) llamado sincitia (células gigantes), se tornan inmóviles, adquieren una forma abultada para formar y depositar los huevos. Los machos carecen de aparato digestivo funcional. Como ejemplos representativos de este grupo, están: *Globodera*, *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Nacobbus*, *Punctodera* y *Cactodera*.

Los **endoparásitos migratorios**, retienen su movilidad y no están fijos en un sitio de alimentación dentro de los tejidos de la planta. Se alojan y migran a través de los tejidos, no forman células modificadas de alimentación, ni saco de huevos, y todos sus estados de desarrollo son parasíticos. Ejemplos representativos de este grupo son: *Hirschmanniella*, *Radopholus* y *Pratylenchus*.

## **B. PRINCIPALES NEMATODOS QUE AFECTAN AL TOMATE**

De acuerdo con Hernández (2010) los nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de tomate riñón son: *Aphelenchoides sp.*, *Aphelenchus sp.*, *Criconemoides sp.*, *Criconemella*

*spp. Ditylenchus sp. Helicotylenchus spp. Meloidogyne sp. Paratrichodorus sp. Pratylenchus spp. Tylenchus sp. Xiphinema sp. Nacobbus sp.*

## 1. *Meloidogyne* spp

### 1.1. Clasificación taxonómica

**Reino:** Animal

**Phylum:** Nematoda

**Clase:** Secernentea

**Orden:** Tylenchida

**Superfamilia:** Tylenchoidea

**Familia:** Meloidogynidae

**Género:** *Meloidogyne*

Las especies más comunes, económicamente importantes y causantes del 90% de daño a cultivos agrícolas, a nivel mundial, son: *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenariay* *M. hapla* (Eisenback *et al.*, 1983).

La especie *M. incognita* es la dominante, otras especies identificadas de menor incidencia son, *M. javanica*, *M. graminícola*, *M. arenaria* y *M. hapla*. En los campos cultivados del país, las poblaciones de nemátodos agalladores se encuentran en mezclas de especies y razas que a su vez están en interacción con otros géneros de nemátodos, como *Rotylenchulus* spp, *Helicotylenchus* spp y *Pratylenchus* spp (Triviño, 1996).

Según Eisenback *et al.*, (1983), las principales características de estas especies, basadas en la morfología de los modelos perineales de los genitales de hembras adultas, son:

***Meloidogyne incognita*.** Arco dorsal alto, cuadrado y sin líneas laterales claramente visibles, es la característica determinante para identificar a esta especie.

***Meloidogyne javanica*.** Arco bajo a redondeado y con líneas laterales bien visibles que separan las estrías dorsales de las ventrales, es la característica determinante para identificar a esta especie; sin embargo, en ocasiones el arco puede ser alto.



*Meloidogyne arenaria*. Arco dorsal con “hombreras”, formadas por ondulaciones pronunciadas de las estrías dorsales, cerca de las líneas laterales que son visibles, y las estrías que se bifurcan, también cerca de las líneas laterales, son los caracteres más importantes de esta especie.

*Meloidogyne hapla*. El modelo perineal no presenta líneas laterales bien visibles; en conjunto, presenta la forma de hexágono redondeado a óvalo aplanado y la presencia de puntuaciones en el área en que termina la cola.

## 1.2. Ciclo de vida

El ciclo biológico del género *Meloidogyne* es igual en todas sus especies y es partenogenética (Eguiguren y Defas, 1992; Mugnier, 1998), comienza con un huevo generalmente en estado unicelular, depositado por la hembra que está completamente incrustada en una raíz del hospedero por ser un endoparásito sedentario. Los huevos son depositados en una matriz gelatinosa cuya función es la de proteger y mantenerlos agrupados sin contacto directo al medio ambiente, encontrándose más de 1000 huevos en una masa que puede ser más grande que el cuerpo de la hembra. Bajo ciertas condiciones favorables, el ciclo de vida lo puede completar entre 20 a 30 días (Orion *et al.*, 2001).

Una hembra es capaz de ovipositar entre 200 y 400 huevos y cada huevo da origen a una larva. Dentro del huevo ocurre la primera muda formándose un juvenil del segundo estadio (J2) de *Meloidogyne* spp., cuando los juveniles de este estadio se ponen en contacto con las raíces, a menudo entran inmediatamente y lo hacen por detrás de la radícula, pero puede suceder por cualquier sitio (Gheysen y Jones, 2006). Estos juveniles penetran la rígida pared celular de la raíz mediante una combinación de fuerzas físicas y bioquímicas.

Las primeras, provocadas con el estilete y las segundas mediante enzimas peptolíticas y celulolíticas, que ocasionan la ruptura de la pared celular. La penetración puede ocurrir a manera de infestación múltiple, donde varios J2 invaden una misma raíz, o de forma individual (Davis *et al.*, 2000). Bajo condiciones adversas de temperatura y humedad, los huevos tienen el potencial de permanecer viables por varios meses al interior de las raíces afectadas.

Cuando el nematodo origina la formación de agallas o nudosidades como consecuencia de la hipertrofia e hiperplasia de los tejidos, las raíces hospederas se convierten en sitios primarios de alimentación de los nematodos. Las células gigantes son densamente citoplasmáticas y multinucleadas (He, Magill y Starr, 2005). La temperatura, humedad y hospederero están estrechamente relacionados con el ciclo de vida.

### **1.3. Distribución geográfica y rango de hospederos del género de *Meloidogyne***

El género *Meloidogyne* se encuentra distribuido en todo el mundo, pero con mayor incidencia y severidad en regiones de clima cálido y tórrido e inviernos cortos y moderados. No se conocen los hábitos originales de las especies de este género. Ataca a más de 2000 especies de plantas incluyendo la mayoría de los cultivos (Agrios, 1988).

### **1.4. Distribución de *Meloidogyne* en Ecuador**

En Ecuador *Meloidogyne* está distribuido en todos los estratos geográficos y *M. incognita* es la especie más abundante con el 80 % de incidencia; las densidades poblacionales más altas se encuentran en las áreas climáticas cálidas incluyendo los Valles de la Sierra, atacando alrededor de 800 plantas hospedantes incluyendo malezas (Triviño, 2004; Revelo, 2002).

En la región interandina las poblaciones más altas se encuentran en los valles del Chota, Catamayo y Santa Isabel (Triviño *et al.*, 1998).

Revelo (2002), señala que este género está representado por cuatro especies cuya distribución y rango de hospederos es el siguiente:

***Meloidogyne incognita*** se encuentra en las regiones de la costa, sierra y oriente. Parasita raíces de tomate riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill), tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt), fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), col (*Brassica oleracea* L.), papaya (*Carica papaya*), pimiento (*Capsicum annuum* L.), arveja (*Pisum sativum*), haba (*Vicia faba* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), babaco (*Carica pentagona* Heilborn), banano (*Musa* sp.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), grama, falsa naranjilla, guandul (*Cajanus cajan*), maíz (*Zea*

mayz L.), maní (*Arachis hypogea*L), rosas en invernadero, varias clases de flores de verano, naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) y muchas malezas.

*Meloidogyne javanica* se encuentra en ciertos sectores de la costa. Parasita caña de azúcar y tomate.

*Meloidogyne hapla* se encuentra en ciertas zonas de la sierra. Parasita papa y actualmente rosas en invernadero.

*Meloidogyne arenaria* se encuentra en ciertos sectores de la sierra. Parasita raíces de piretro y fréjol.

### **C. PÉRDIDAS QUE CAUSAN LOS NEMATODOS**

Los nematodos fitopatógenos causan en la producción agrícola un daño anual estimado en 80 mil millones de dólares (Nicol et al., 2011), entre ellos destacan los nematodos formadores de quistes y los nematodos agalladores.

El nematodo agallador de raíces *Meloidogyne spp.* Es una plaga de importancia económica a nivel mundial. Se reportan pérdidas de la producción por causa de este nematodos en aproximadamente 115 mil millones de dólares anual. Los nematodos agalladores son patógenos con un amplio rango de huéspedes que incluye la mayoría de los cultivos de importancia económica global (Jones et al., 2013).

De acuerdo a EUROSTAT (2014). España el segundo productor de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la Unión Europea con un rendimiento de 3770,8 toneladas en 2013, uno de los principales daños que sufre el tomate, es el ataque por nematodos, especialmente nematodos agalladores.

### **D. PROBLEMAS QUE CAUSAN LOS NEMATODOS EN TOMATE**

*Meloidogyne spp.* en su segundo estadio (J2) penetra en las raíces y aproximadamente en 48 horas forma agallas o hinchazones, donde se alojan las hembras adultas. Las plantas bajo estas condiciones demuestran varios grados de enanismo, clorosis y tendencia a marchitarse en condiciones de humedad (Eguiguren y Defas, 1992), limita los

rendimientos de los cultivos susceptibles a *Meloidogyne* (Porazinska and Coleman, 1995). Las plantas pueden mostrar un sistema radical poco desarrollado con una gran cantidad de raíces secundarias, deficiente anclaje y reducida capacidad de absorción de agua y nutrientes. Además, se puede observar florecimiento precoz y la disminución en el peso de la hoja y el tamaño del fruto (Jiménez *et al.*, 2001).

## **1. Principales síntomas causados por nematodos fitoparásitos**

Los síntomas pueden variar de acuerdo con el hábitat parasítico del nematodo, la relación parásito hospedante y otros factores tales como la edad de la planta y sus condiciones fisiológicas (Manzanilla-López *et al.*, 2004). Las infecciones causadas por nematodos fitoparásitos pueden resultar en la aparición de síntomas en raíces y tejidos aéreos de las plantas (Agrios, 2005).

### **1.1. Síntomas primarios ocasionados por nematodos que atacan el sistema radical**

Los síntomas ocasionados por los nematodos fitoparásitos, generalmente no pueden ser distinguidos de los ocasionados por otros organismos habitantes del suelo como hongos, bacterias, protozoarios, insectos, etc., o los ocasionados por condiciones ambientales adversas. Generalmente, los daños causados por los fitonematodos en las raíces son reflejados en los tejidos aéreos como crecimiento deficiente de tallos, clorosis de hojas y aun muerte de plantas, etc.; debido a una reducida absorción de agua y nutrientes por las raíces secundarias, lo cual influye en el potencial de agua en las hojas, conductividad estomatal, transpiración y conductividad. (Seinhorst, 1981).

De acuerdo con Luc *et al.* (2005), Guzmán-Piedrahita *et al.* (2009) y Perry *et al.* (2009), los síntomas más importantes causados por nematodos fitoparásitos que atacan el sistema radical son:

- Menor cantidad y longitud de raíces, especialmente las raíces secundarias de alimentación atacada por *Helicotylenchus dihystera*
- Desarrollo anormal de raíces:
- Nudos o agallas
- Raíces abultadas (inflamadas) y redondeadas afectadas por *Meloidogyne* spp.

- Raíces con acumulación anormal de partículas
- Supresión del crecimiento de raíces como *Meloidogyne spp.*
- Formación de costras o verrugas en raíces
- Hiperplasia de raíces como en tomate afectado por *Meloidogyne spp.*

## **1.2. Síntomas secundarios de nematodos que atacan el sistema radical.**

Los síntomas son similares a los causados por cualquier daño que interfiere con el soporte físico y la absorción de agua y nutrientes; resultando en varios síntomas de deficiencia de acuerdo con las características químicas y físicas del suelo, disponibilidad de agua y nutrientes, la parte de la planta involucrada, la especie del hospedante y el nematodo mismo (Jenkins & Taylor, 1967).

Situaciones que conducen a que se incremente el tiempo de siembra a floración, de floración a cosecha, entre floraciones y entre cosechas, además de reducirse la longevidad de las plantas. También se presenta reducción del tamaño de las plantas, número de hojas, rendimiento y vida productiva del cultivo (Araya, 2003; Gowen *et al.*, 2005).

Los síntomas son usualmente más pronunciados si las plantas están ya afectadas por condiciones de crecimiento adversas o están siendo atacadas por otros patógenos. (Guzmán *et al.*, 2012)

Cuando las plantas crecen en condiciones óptimas y son fuertemente atacadas por fitonematodos, pueden mostrar síntomas leves en la parte aérea. Bajo tales circunstancias, los nematodos se reproducen mejor y pueden representar una amenaza oculta y severa para los cultivos subsiguientes (Manzanilla-López *et al.*, 2004; Agrios, 2005).

Así mismo, de acuerdo con Gowen *et al.* (2005) los síntomas secundarios en la parte aérea de las plantas ocasionados por nematodos que atacan el sistema radical son:

- Reducción del crecimiento (enanismo)
- Amarillamiento del follaje (clorosis), similar a síntomas de deficiencias nutricionales
- Marchitamiento o flacidez de hojas como en tomate atacado por *Meloidogyne spp.*
- Muerte prematura de plantas

- Disminución en el número de hojas y muerte progresiva de la planta
- Reducción de la vida útil del cultivo y como consecuencia, disminución del rendimiento y calidad del producto cosechado

### 1.3. Manejo de poblaciones de *Meloidogyne*

El manejo de altos niveles poblacionales de *Meloidogyne*, al igual que otros géneros de nematodos fitoparásitos puede ser reducido con el empleo de nematicidas, rotación de cultivos, inundación del lote a cultivar, secamiento del suelo, barbechos limpios de malezas, uso de plantas antagónicas como *Crysanthemum* spp, *Tagetes* spp, *Ricinus communis*, *Crotolaria juncea* (McSorley, 1999).

En el suelo existen hongos y bacterias que en forma natural atacan a los nematodos, entre estos están reportados: *Paecilomyces lilacinus*, *P. oxalicum*, *Catenaria* spp, *Verticillium* spp, *Stagonospora* spp, *Poma* spp (Kim & Rigges, 1999), *Penicillium anaticum* y *Aspergillus niger* (Chen y Dickson, 1977). La bacteria *Pasteuria penetrans* está determinada como un enemigo potencial del nematodo agallador y se encuentra distribuida ampliamente en los campos hortícolas de la región Litoral del Ecuador (Triviño, 2004).

## E. HONGOS NEMATÓFAGOS COMO AGENTES DE BICONTROL.

Los nematodos han sido blancos primarios para el control biológico debido a su importancia como plaga. En este sentido, algunos hongos y bacterias se han mostrado como antagonistas. Según Timper (2000) la acción de los antagonistas introducidos puede ser alta por la rapidez y supresión sustancial de la población de nematodos.

Rodríguez, Boube y Young (1991) manifiestan que existen biocontroladores como los géneros de hongos *Arthrobotrys Catenaria*, y *Arthrobotrys oligospora*, que forman estructuras miceliales que pueden inmovilizar o destruir al nemátodo.

Fernández *et al.* (2000) indican que en Cuba se brinda una panorámica de la situación actual y perspectivas de las alternativas de control de nematodos para cada cultivo, considerando los aspectos legales, culturales, genéticos, físicos, químicos y manejo integrado. Igualmente, señala el estado actual de desarrollo de agentes biocontroladores

como es el caso de los hongos *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, *Trichoderma* spp, *Arthrobotrys* spp y *Paecilomyces* spp.

Castellano (2001) manifiesta que los hongos nematófagos aparecen en todos los grupos fungosos y están divididos en los que tienen estructura especializada que capturan nematodos y otros que son productores de toxinas. Los hongos de estructuras adhesivas (hongos atrapadores), no son muy efectivos para el control biológico, pueden ser útiles en ciertas situaciones, en los invernaderos, donde los suelos son siempre esterilizados, y además se les incorpora grandes cantidades de materia orgánica e inoculo fungosos.

Volcy (1996) manifiesta que los fitonematodos al igual que otros fitoparásitos o patógenos, tienen una gama extensa de enemigos naturales de los cuales se destacan *Paecilomyces lilacinus*, *Pasteuria penetrans* y hongos nematófagos. El hongo *P. lilacinus* es un Ascomycete que produce conidias hialinas unicelulares, es uno de los antagonistas más promisorios en la lucha biológica de nematodos, su éxito radica en que ataca a los huevos (ovicida) una de las etapas claves en el ciclo del parásito.

Según PLABI (2003) el hongo *P. lilacinus* acciona puede parasitar huevos de nematodos, estadios juveniles y adultos, durante esta etapa inicial no hay producción de toxinas, cuando las esporas del hongo entran en contacto con los nematodos se inicia el proceso de infección porque encuentran las condiciones ideales para iniciar el proceso de germinación, estas esporas producen enzimas que diluyen la cutícula y penetran al interior del nematodo.

Cuando ingresa al hospedero, el hongo *Paecilomyces* spp se reproduce muy rápidamente emitiendo metabolitos tóxicos que envenenan al nematodo (causándole deformaciones, vacuolizaciones y pérdida de movimiento) hasta causarle la muerte. Teniendo en cuenta que el nemátodo es más frágil durante su primer estado (huevos), se recomienda hacer aplicaciones de *Paecilomyces* spp en forma de lavado del suelo al inicio del cultivo. Las ventajas del uso de este antagonista son: regular las poblaciones de nematodos a niveles bajos, las esporas le afectan en forma permanente durante el ciclo del cultivo. Por ser un regulador natural, mantiene las poblaciones de nematodos a niveles que no causan daño económico.

La presencia de nematodos es cada vez menor debido al trabajo progresivo de los microorganismos. Si se regulan los nematodos con formulaciones de *P. lilacinus*, se restablecen el balance natural del ecosistema. Generalmente estos formulados a base de esporas en latencia de *P. lilacinus* han sido recuperados del campo, donde afectan a diferentes nematodos (PLABI, 2003).

Rodríguez *et al.* (1991) manifiestan que entre los géneros de hongos endoparásitos se pueden citar a *Catenaria* spp., *Myzocytyium* spp., *Hoptoglasa* spp., *Mirestacrum* spp., *Verticillium* spp., *Cephalosporium* spp., *Harpororium* spp., Existen hongos asociados con los quistes y huevos de nematodos de los géneros *Globodera* spp., *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp., los más importante son: *Cylindrocarpon* sp., *Exophilo* sp., *Fusarium* spp., *Gliocladium* sp., *Paecilomyces* sp., *Verticillium* sp.

Se han reportado más de 150 especies de hongos que afectan a nematodos de diferentes formas, entre estos se encuentran *Stylopage* spp., el cual efectúa la captura por medio de hifas adhesivas individuales; *Arthrobotrys* spp., y *Nematoctenus* spp., los cuales poseen una especie de nódulos que se adhieren a la cutícula del nemátodo; y en el caso de *Dactylaria* spp, éste forma anillos con los cuales capturan a los nematodos (Goes, Van y Rooy, 1991).

Sharon *et al.* (2002) afirman que *Trichoderma harzianum* es un agente de biocontrol el cual actúa afectando a los nematodos de varias formas: 1) parasitismo directo sobre los estadíos de huevo y juvenil 2) Metabolitos, producidos por el hongo que afecta la viabilidad de los huevos. La habilidad de parasitismo *in vitro* fue presentada en diferentes niveles, por todas las cepas probadas.

Zuckerman, Dickow y Acosta (1993) reportaron la eficacia de una cepa de *B. thuringiensis* contra *M. incognita* y *Rotylenchulus reniformis* en experimentos de campo y en condiciones semicontroladas. Las aberturas del cuerpo de estos nematodos son muy pequeñas como para permitir la penetración de la bacteria, por lo que sugirieron que el modo de acción podía atribuirse a la exotoxina o a una endotoxina muy específica, liberada con la lisis celular.



Experimentos realizados por Sharma (1994) mostraron diferencias en los niveles de control de *M. incognita* entre las especies *B. thuringiensis* y *B. kurstaki* (53-65 %); no se detectaron diferencias significativas entre parámetros como la altura, peso fresco de la raíz y de la planta con respecto al testigo. Las formulaciones comerciales que contienen solamente la endotoxina han resultado eficaces para el control de *Meloidogyne javanica* y *Tylenchulus semipenetrans* (Leyns *et al.*, 1995) y Noel (1990) informó sobre los efectos nematostáticos y nematocidas de la exotoxina sobre *Meloidogyne incognita* y *Heterodera glycines*.

Diecinueve aislamientos de *Paecilomyces lilacinus* de diferentes países y regiones de Brasil más un aislamiento de *Cylindrocarpon destructans* fueron evaluados *in vitro* por su parasitismo en huevos de *Meloidogyne javanica*. Los aislamientos variaron en su habilidad para colonizar huevos. En estudios bajo invernadero con plantas de tomate, aislamientos de *P. lilacinus* y *C. destructans* redujeron el número de agallas de *M. javanica* pero diferenciaron en su eficacia. Los aislamientos procedentes de Francia e Italia fueron los más efectivos en los experimentos *in vitro* e invernadero (Freitas, Ferraz y Muchovej, 1995).

Se investigó la actividad del hongo mutualista endofítico *Fusarium oxysporum* 162 (FO162) contra el nemátodo agallador *Meloidogyne incognita*. Se ha demostrado que ésta cepa del hongo reduce el daño causado por *M. incognita* al inhibir la penetración y el desarrollo de juveniles cuando se encuentra presente en las raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Los resultados de este estudio indican que la inoculación de plantas de tomate con FO162 al momento de la siembra en bandejas causa reducción significativa en la cantidad de agallas y de masas de huevos.

### **1. Características generales de antagonistas biocontroladores de los nematodos**

*Paecilomyces lilacinus*, presenta colonias que alcanzan 5-7 cm en 14 días a 25 °C en MEA (agar extracto de malta) con tonalidades violetas al reverso, incoloro o vino. Conidióforos erectos 400-600 µm de altura, mayormente solitarios del micelio horizontal, de 3-4 µm de ancho, amarillo a púrpura, paredes rugosas con fiálides agrupadas densamente. Conidios fusiformes a elipsoidales, paredes lisas a suavemente rugosas, 2.5-3 x 2 - 2.2 µm. Puede producir conidióforos, es típico del suelo. Tiene alguna actividad antagonista contra

bacterias y hongos. Produce el antibiótico peptídico leucinosatatina, efectivo contra un amplio rango de hongos y bacterias Gram positivas (Banal y Wailand, 1988).

*Trichoderma* spp, produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidospora y conidias, estas últimas son las activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de las esporas hasta la esporulación. El parasitismo puede ser observado a través de penetración en forma de encolamiento de hifas, producción de haustorios y desorganización del contenido celular (Chet, 1987).

*Cylindrocarpon destructans*, tiene la particularidad de producir esporas en PDA, inicialmente con un halo blanco para luego convertirse en colonias anaranjadas. Aislado puede tener un micelio rosa pálido; las colonias pueden medir de 26-30 mm diámetro después de los 10 días que la superficie de la colonia asume gradualmente una apariencia polvorienta o escarchada con formación creciente de las microconidia y el micelio etéreo desarrolla para palidecer primero las microconidias que son abundantes y pueden medir de 36 a 45  $\mu\text{m}$  de longitud y 2 - 2.5  $\mu\text{m}$  de anchas (Stover 1972).

*Pochonia chlamydosporia*, forma colonias de rápido crecimiento, han determinado que en 10 días presentan 15-40 mm de diámetro. Los conidióforos usualmente postrados y pequeñas hifas diferenciadas, algunas veces erectas, fiálides verticiladas o solitarias, conidios de forma subglobosa, elipsoidal a bacilar. Producen dictioclamidosporas sobre la superficie de la colonia o en el agar sumergido con cristales ausentes (Gams y Zare, 2001).

## **F. INTERACCIONES TRÓFICAS ENTRE HONGOS Y NEMATODOS**

Los hongos nematófagos son organismos del suelo que poseen la capacidad de transformar sus micelios en trampas especializadas para capturar y destruir nematodos ya sea en el suelo o en las heces de los animales (Barron et al., 1997).

### **1. Estructuras producidas por los hongos nematófagos**

Las trampas producidas por los hongos nematófagos pueden ser de diversos tipos dependiendo del género y especie que se traten y que se describen e ilustran a continuación. (Mendoza y Valero, 2009)

**Botones adhesivos** Son estructuras en forma de pequeños bulbos o botones que producen una sustancia adhesiva en donde los nematodos son capturados e inmovilizados.

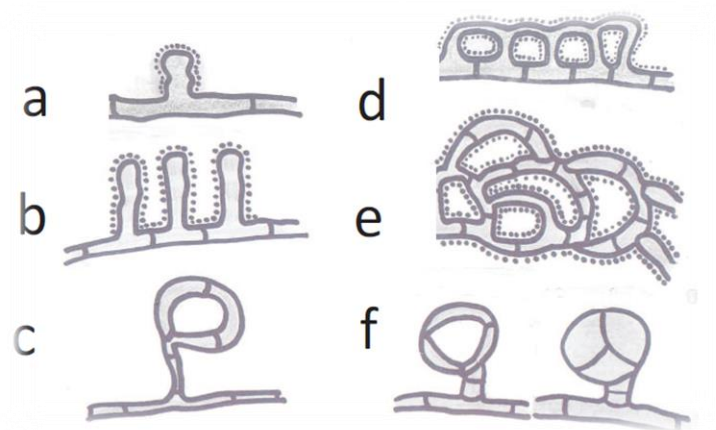
**Ramas o dedos adhesivos** Son estructuras en forma de columnas o dedos adhesivos. Los nematodos son capturados por adhesión a las ramas.

**Anillos simples** Estos anillos son órganos pasivos y su diámetro es de un calibre similar al de la mayoría de los nematodos del suelo. Los nematodos son capturados por el deslizamiento a través del anillo, el cual entra a presión alrededor su cuerpo

**Redes adhesivas escalariformes** Son estructuras que inician su desarrollo al igual que las ramas o columnas adhesivas, pero se anastomosan en su parte superior. Los nematodos son capturados por adhesión.

**Redes adhesivas** Son redes adhesivas de anillos tridimensionales. Los nematodos son capturados en dichas redes. Estos órganos de captura son los más comunes, secretando una capa de sustancia adhesiva en su superficie.

**Anillos constrictores** Están formados por tres células que se hinchan cuando un nematodo penetra en el interior del anillo.



**Figura 1.** Aspecto de órganos de captura de hongos nematófagos nematodos

- a) Botón adhesivo b) Ramas o dedos adhesivos c) Botón simple  
 d) Redes escalariformes e) Redes tri-dimensionales f) anillos constrictores

## 2. Clasificación de hongos nematófagos

De acuerdo con Mendoza y Valero (2009) la interacción hongo-nematodo dependiendo de su modo de infección se divide en:

**Hongos atrapadores de nematodos** Estos hongos forman diversos tipos de órganos de captura a partir de la especialización de sus hifas. Son medios o buenos saprotrofos, y en muchos casos la formación de las trampas debe ser inducida por los propios nematodos. Hay dos mecanismos diferentes en la función de las trampas: adhesivos y mecánicos (Nordbring-Herts et al., 1982). Sea cual sea el mecanismo, el hongo penetra la cutícula del nematodo por la trampa formando el bulbo de infección dentro del nematodo, a partir del cual las hifas tróficas crecen dentro del cuerpo y digieren sus contenidos (Jansson and Nordbring-Hertz, 1988).

Dentro de los géneros más comúnmente estudiados de hongos atrapadores de nematodos son *Arthrobotrys*, *Monacrosporium* (Van Oorschot, 1985, Rubner, 1996) y *Duddingtonia flagrans* (Campos et al., 2009).

**Hongos endoparásitos o endozóicos** Los hongos endoparásitos utilizan sus esporas para infectar nematodos. Estos hongos son a menudo parásitos obligados de nematodos, y fuera del cuerpo infectado del nematodo aparecen sólo como estructuras de diseminación. Las esporas de estos hongos pueden ser zoosporas móviles (*Catenaria spp.*) que se enquistan sobre el nematodo adhiriéndose a él y penetrando la cutícula, conidios adhesivos (*Drechmeria coniospora*) o conidios que son ingeridos (*Harposporium spp.*) por los nematodos bacteriófagos (Barron, 1977).

**Hongos parásitos de huevos** Estos hongos infectan estadios no móviles (huevos) de nematodos. Producen apresorios que son estructuras de infección en los extremos de las hifas que se adhieren a la cubierta del huevo. La cubierta del huevo es penetrada por el hongo y el contenido es digerido. (Barron, 1977). Los géneros más comunes de este grupo son *Pochonia =Verticillium) spp.* y *Paecilomyces spp.*

**Hongos productores de toxinas** El hongo más común de este grupo es el descomponedor de madera *Pleurotus ostreatus* y otros *Pleurotus spp.* Las hifas de estos hongos unos

"tallos" cortos que contienen una gota de toxina. Tras ponerse en contacto con la toxina, el nematodo es rápidamente inmovilizado y las hifas del hongo crecen quimiotrópicamente (dirigidas) a través de la boca del nematodo, que como en el caso de los anteriores hongos nematófagos, es digerido. (Mendoza y Valero, 2009)

## **IV. MATERIALES Y METODOS**

### **A. CARACTERISTICAS DEL LUGAR**

#### **1. Localización**

El ensayo se realizó en el laboratorio del Departamento de Biología de la ESPOCH ubicada en el cantón Riobamba provincia de Chimborazo.

#### **2. Ubicación Geográfica**

Latitud: 1° 38' S

Longitud: 78° 40' W

Altitud: 2820 m.s.n.m.

#### **3. Condiciones Meteorológicas<sup>1</sup>**

Temperatura promedio: 13,4° C

Precipitación: 163 mm

Humedad relativa: 70,3%

#### **4. Clasificación Ecológica.**

Según la clasificación de zonas ecológicas, la zona de ESPOCH ecológicamente se clasifica como bosque seco Montano Bajo (bsMb). (HOLDRIGE, L.1992).

#### **5. Condiciones de laboratorio**

Temperatura promedio: 22 °C

Humedad relativa: 60%

### **B. MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **1. Materiales y equipos campo**

- Barreno
- Fundas plásticas tipo ziploc
- Marcador

---

<sup>1</sup> Estación Meteorológica de la ESPOCH

- GPS
- Etiquetas
- Hojas de registro

## **2. Materiales y equipos de laboratorio**

- Tamices 25, 60, 400, 500 mesh
- Embudos de cristal
- Centrifuga 3000 rpm
- Tubos de ensayo plásticos con tapa 13mL
- Tubos de ensayo de cristal con tapa 13 mL
- Frascos de cristal con tapa de 100mL, 500mL y 1000mL
- Agua destilada
- Licuadora
- Cuchillo
- Recipientes plásticos 500mL y 1000 mL
- Cloro comercial (TQ5)
- Solución azucarada (400 gr azúcar/1000 agua)
- Cámara de aislamiento de flujo laminar
- Cámara microscópica digital (10mp)
- Medios de cultivo: agar-agua, PDA, Agar maíz 1/4
- Platos de Petri (normales y tripetri)
- Autoclave
- Aguja de aislamiento
- Alcohol potable (96°)
- Mechero
- Marcador permanente
- Incubadora
- Balanza digital
- Estereoscopio
- Microscopio
- Hemocitómetro

**d. Materiales y equipos de oficina**

- Computador.
- Marcadores.
- Calculadora.
- Grapadora
- Perforadora

**C. METODOLOGÍA****1. ACTIVIDADES PRELIMINARES****1.1. Muestreo de suelos**

Se tomaron muestras de suelos procedentes de cinco agroecosistemas, el muestreo fue al azar siguiendo un patrón en zigzag. Con el barreno se recogió la muestra a una profundidad de 20 cm, se hicieron 5 sub muestras por cada suelo. (Valencia y Hernández 2002). Se tomó información de utilidad, punto geográfico, altitud, cultivo, variedad, etc.

**1.2. Determinación de pH porcentaje de humedad (%H) y materia orgánica (%MO)**

Se mezcló 10 g de suelo con agua destilada en una proporción 1:2,5 la agitamos por 10 minutos, se dejó reposar y posteriormente se efectuó la lectura en el pHmetro. (Willard et al., 1974; Bates, 1983)

La determinación del porcentaje de humedad se realizó mediante diferencias de peso húmedo y seco, se pesó la muestra de suelo en una cápsula de porcelana, se colocó en la estufa a 105 °C por 24 h, se registró el peso seco a las 24 h restándole el peso de la cápsula y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{pH - pS}{pH} \times 100$$

**pH**= peso húmedo

**pS**= peso seco



El porcentaje de materia orgánica se realizó mediante el método de ignición o calcinación, se sometió la muestra a 450°C por 30 minutos, registramos el peso seco 2 y realizar las diferencias de pesos (Steubing, Godoy, & Alberdi, 2001).

$$\%MO = \frac{pS - pS2}{pS} \times 100$$

pS2= peso seco después de 30 minutos a 450 °C

### 1.3. Aislamiento de hongos

El aislamiento se efectuó mediante el método de dilución seriada se pesó 20 g de suelo, se colocó en 80 mL de agua destilada estéril, dejamos la muestra en el agitador magnético por 15 minutos. Posteriormente se realizó diluciones sucesivas hasta obtener las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , con la micro pipeta se tomó una alícuota de 1 mL y se sembró en medio de cultivo PDA + Cloranfenicol, utilizando el rastrillo de vidrio se dispersó la alícuota por toda la superficie de la placa, se iniciaron 2 repeticiones por cada dilución. (Ramírez et al., 1992)

Se incubó por un lapso de 3 días a 25°C para los suelos de San Luis, Pallatanga, Estación Experimental Querochaca y 5 días a temperatura ambiente (20-22°C) para los suelos de Guallanchi y San Juan.

### 1.4. Unidades formadoras de colonias

Una vez incubadas se procedió a realizar el conteo de las colonias por cada dilución obteniendo un promedio de las dos repeticiones, con el dato obtenido se aplicó la siguiente fórmula para obtener las ufc/mL:

$$N = \frac{n \cdot 10^x}{v}$$

N=ufc/mL

**n**=promedio de numero de colonias contadas en cada repetición

**10<sup>x</sup>**=Valor de la dilución (con exponente positivo), en el que se contó la colonia

**v**=volumen inoculado (mL)

### **1.5. Aislamiento y purificación de colonias**

Se realizaron aislamientos de las diferentes colonias usando una asa para lo cual, se tomó una muestra de cada colonia y se procedió a inocular en medio de cultivo PDA, se incubó a temperatura ambiente o 25°C dependiendo del origen del aislamiento, durante 3 a 5 días. Este procedimiento se repitió hasta obtener cultivo puro, registramos el número de cultivos puros por muestra de suelo, y se almacenaron en tubos de agar inclinado, dos por cada aislamiento.

### **1.6. Identificación de aislamientos**

Una vez obtenidos cultivos puros de los hongos, se procedió a describir las características macroscópicas de la colonia, a través de los métodos de montaje de cinta pegante (impronta) y transfirió micelio con el asa, se preparó placas portaobjetos, añadimos azul de algodón para contrastar de manera que se puedan observar las estructuras microscópicas características.

La identificación se hizo mediante claves taxonómicas como la clave de Barrón (1977), Compendio de Hongos del suelo de DOMSCH & GAMS (1993) entre otras. Registraremos características macro y microscópicas de los aislamientos.

### **1.7. Selección de hongos con potencial nematófagos**

Para el efecto se usó la técnica de nematodos cebo (Wyborn et al. 1969) se tomó un disco de la colonia de aproximadamente 1 cm de diámetro y se lo colocó en una caja de Petri con medio de cultivo Agar maíz 1/4, los nematodos cebo fueron extraídos de heces de conejo en total de 90 (*Passalorus sp.*) individuos por repetición, las placas fueron evaluadas a los 4 días para contar en número de nematodos muertos o parasitados.

Dependiendo de la procedencia del hongo, la temperatura de incubación osciló de 20-28°C y el tiempo 2-4 días.

Posteriormente se colocó en tres puntos de la caja la suspensión de larvas y se los dejó a temperatura ambiente por 4 días. Los microorganismos que presenten a partir del 30% de colonización fueron los seleccionados para las posteriores pruebas.

### **1.8. Extracción y desinfección nematodos**

Los nematodos cebo fueron aislados de heces de conejo a través del método de embudos de Baerman, 100 g de heces se colocaron en el embudo durante 24 h, los nematodos recolectados fueron centrifugados durante 1 minuto para eliminar el exceso de agua, se lavaron con una solución al 2% de hipoclorito de sodio comercial durante 1 minuto, posteriormente enjugados con agua destilada estéril.

Los nematodos fitoparásitos se obtuvieron de nódulos de raíces de tomate riñón, se lavaron con abundante agua para eliminar el suelo, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 4% durante 5 minutos, con la ayuda de un bisturí y la aguja de disección se sacaron los nódulos y masas de huevos se depositaron en placas Petri con agua destilada estéril más cloranfenicol (0,01 gr/100 mL) por 2 minutos para finalmente depositarlas en cajas Petri con agua destilada estéril y dejarlas a temperatura ambiente hasta la eclosión de huevos (6-10 días).

### **1.9. Densidad poblacional de nematodos de la rizosfera del tomate**

Se realizó un muestreo de suelos de las principales comunidades donde se cultiva tomate riñón. La extracción se hizo mediante la técnica del centrifugado y flotación (Caveness y Jesen 1955) que consistió en pesar 100 gr de muestra de suelo y colocarlo en 1 lt de agua de llave, se mezcló durante cinco minutos y se dejó reposar durante 30 segundos , para luego pasar la suspensión por los tamices de 25, 60, 500 mesh respectivamente, este proceso se repitió por dos ocasiones, en un tubo de ensayo plástico con tapa se recolecto el material sobrante del tamiz de 500 mesh, y se centrifugo durante 5 minutos, eliminamos el exceso de agua y colocamos la solución azucarada para mezclarla durante 30 segundo, para volverla a centrifugar por 1 minuto, transcurrido el tiempo recogemos la solución en el tamiz de 500 mesh valiéndonos de la piseta eliminamos en exceso de azúcar y recogimos la solución hasta completar un volumen de 20 mL, para la extracción de estados larvarios juveniles J2.

La extracción de huevos, mediante la técnica del hipoclorito de sodio pesamos 20 gr de raíces y las cortamos en trozos de 1 cm, colocamos en la licuador añadiendo hipoclorito de sodio diluido (4%) y licuamos durante 20 segundos, procedemos a tamizar el contenido

por los tamices de 60, 500 mesh, lo que queda en la tamiz de 500 mesh lo recogemos hasta obtener un volumen de 20 mL; el conteo de hembras a través de la utilización del estereoscopio (Hussey y Barker 1973).

Una vez extraídos los nematodos de la rizósfera del tomate se realizó el conteo de las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre por cada 100 g de suelo, lo mismo se hizo con el número de hembras y huevos.

**Cuadro 1.** Muestreo para la determinación de la densidad poblacional de nematodos

Parroquia	Comunidad	Número de muestras
San Luis	Cabera parroquial	3
	Guaslán	3
	Monjas Tunshi	3
	Corazón de Jesús	3
	San Antonio	3

**Elaboración:** Guaminga, J. 2016

## 2. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Se efectuó 3 repeticiones por cada hongo seleccionado para evaluar el potencial antagonico, se utilizó cajas tri petri con medio de cultivo agar maíz  $\frac{1}{4}$ , cada repetición se inoculó con 300  $\mu$ l de una suspensión de esporas ( $10^8$ ) con el rastrillo se dispersó la suspensión de esporas por toda la placa, se incubo durante 3 días, posteriormente por cada repetición se colocó 0,5 mL de una suspensión de nematodos con 40 nematodos Fitoparásitos estandarizados mediante conteo de 5 alícuotas.

### 2.1. Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con 3 repeticiones.

## 2.2. Tratamientos

Los tratamientos se determinaron después de realizar un ensayo exploratorio para identificar a los posibles hongos con potencial nematófago, obteniéndose 9 aislamientos, de un total de 41 microorganismos nativos.

**Cuadro 2.** Distribución de los tratamientos

<b>Codificación de la cepa</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>GUC</b>	Guallanchi	T0 Testigo
<b>GUE</b>	Guallanchi	T1
<b>GUL</b>	Guallanchi	T2
<b>UTD</b>	Estación Experimental	T3
	Querochaca	T4
<b>SLJ</b>	San Luis	T5
<b>SJA</b>	San Juan	T6
<b>SLE</b>	San Luis	T7
<b>SLB</b>	San Luis	T8
<b>PAD</b>	Pallatanga	T9

**Elaboración:** Guaminga, J. 2016

## 2.3. Esquema del diseño experimental

**Cuadro 3.** Esquema del diseño experimental

<b>Fuentes de Variación</b>	<b>Fórmula</b>	<b>GL</b>
<b>TOTAL</b>	$(TxR)-1$	29
<b>Tratamientos</b>	$(T-1)$	9
<b>Error</b>	$T(R-1)$	20

**Elaboración:** Guaminga, J. 2016

## 2.4. Evaluación

Para los aislamientos seleccionados se utilizó un DCA con tres repeticiones, las variables evaluadas fueron porcentaje de nematodos sin actividad y con actividad a las 24, 48, 72 y 96 horas.

$$\% \text{Nematos sin actividad} = \frac{\text{nemátodos inactivos} \times 100}{\text{nematodos inoculados}}$$

**Número de nematodos con actividad:** Larvas libres aquellas que no presenten estructuras adhesivas o constrictoras, no existe micoparasitismo, presentan movimiento normal.

**Número de nematodos sin actividad:** Larvas parasitadas de nematodos con estructuras adhesivas, constrictoras o hifas que penetren su cuerpo, movimiento lento o nulo en relación al testigo.

## 2.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza ADEVA, previamente se aplicó la transformación de Bliss a los datos, misma que se utiliza para datos porcentuales.

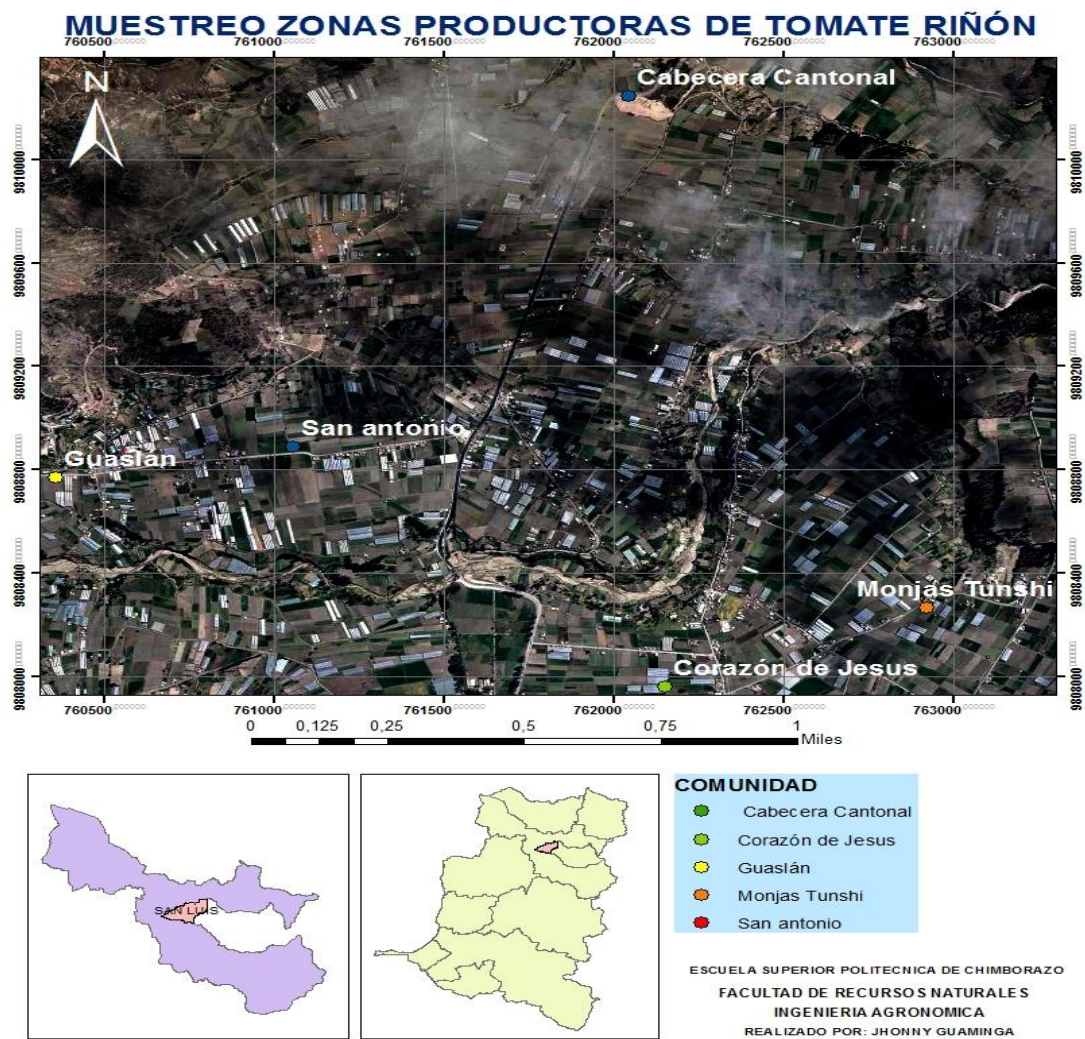
## 2.6. Análisis Funcional

Para los factores e interacciones con significancia estadística se utilizará la prueba de Tukey al 5%.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. ACTIVIDADES PRELIMINARES

#### 1.1. Densidad poblacional de nematodos fitoparásitos en los suelos de la parroquia San Luis



**Figura 2.** Ubicación geográfica de las áreas muestreadas para la determinación de la densidad poblacional de nematodos fitoparásitos

**Cuadro 4.** Densidad poblacional de nematodos fitoparásitos de la rizósfera del tomate riñón

CÓDIGO	COMUNIDAD	ALTITUD	LATITUD	LONGITUD	CONTAJE DE NEMATODOS		TOTAL
					100 gr suelo		
					sin estilete	con estilete	
CC1	Cabecera Cantonal	2682	762043	9810243	32	1424	1456
CC2	Cabecera Cantonal				22	1498	1520
CC3	Cabecera Cantonal				25	1373	1398
CJ4	Corazón de Jesús	2568	757791	9817266	150	1350	1500
CJ5	Corazón de Jesús				98	1302	1400
CJ6	Corazón de Jesús				200	1640	1840
MT7	Monjas Tunshi	2645	762920	9808262	264	1896	2160
MT8	Monjas Tunshi				240	1820	2060
MT9	Monjas Tunshi				250	1902	2152
SA10	san Antonio	2736	761055	9808887	120	2640	2760
SA11	San Antonio				98	2288	2386
SA12	San Antonio				79	2605	2684
GS13	Guaslán	2736	760356	9808769	26	1514	1540
GS14	Guaslán				40	1000	1040
GS15	Guaslán				63	1197	1260

**Elaboración:** Guaminga, J. 2016



De acuerdo al Cuadro 4. se puede observar que existe mayor número de nematodos fitoparásitos en los suelos muestreados, como consecuencia de ello hay una baja cantidad de nematodos de vida libre, los mismos que cumplen funciones importantes dentro del suelo, los nematodos son sensibles a las prácticas de manejo agrícola y a los contaminantes ambientales presentan una distribución diferencial en los suelos según su grado de conservación (Bongers 1999; Ferris et al. 2001; Yeates 2003)

**Cuadro 5.** Densidad población de *Meloidogyne*

Código	Comunidad	Edad del cultivo	N° agallas	Larvas	Huevos y larvas
			100 gr raíz	100 gr suelo	100 gr raíz
CC1	Cabecera Cantonal	4 meses	30	404	362
CC2	Cabecera Cantonal	3 meses	29	426	370
CC3	Cabecera Cantonal	4 meses	35	268	240
CJ4	Corazón de Jesús	3 meses	32	420	329
CJ5	Corazón de Jesús	4 meses	29	392	290
CJ6	Corazón de Jesús	3 meses	53	515	389
MT7	Monjas Tunshi	4 meses	62	653	506
MT8	Monjas Tunshi	4 meses	57	577	450
MT9	Monjas Tunshi	4 meses	42	603	478
SA10	san Antonio	3 meses	60	773	602
SA11	San Antonio	4 meses	51	406	550
SA12	San Antonio	4 meses	61	752	586
GS13	Guaslán	3 meses	27	387	385
GS14	Guaslán	3 meses	22	291	302
GS15	Guaslán	3 meses	29	353	340

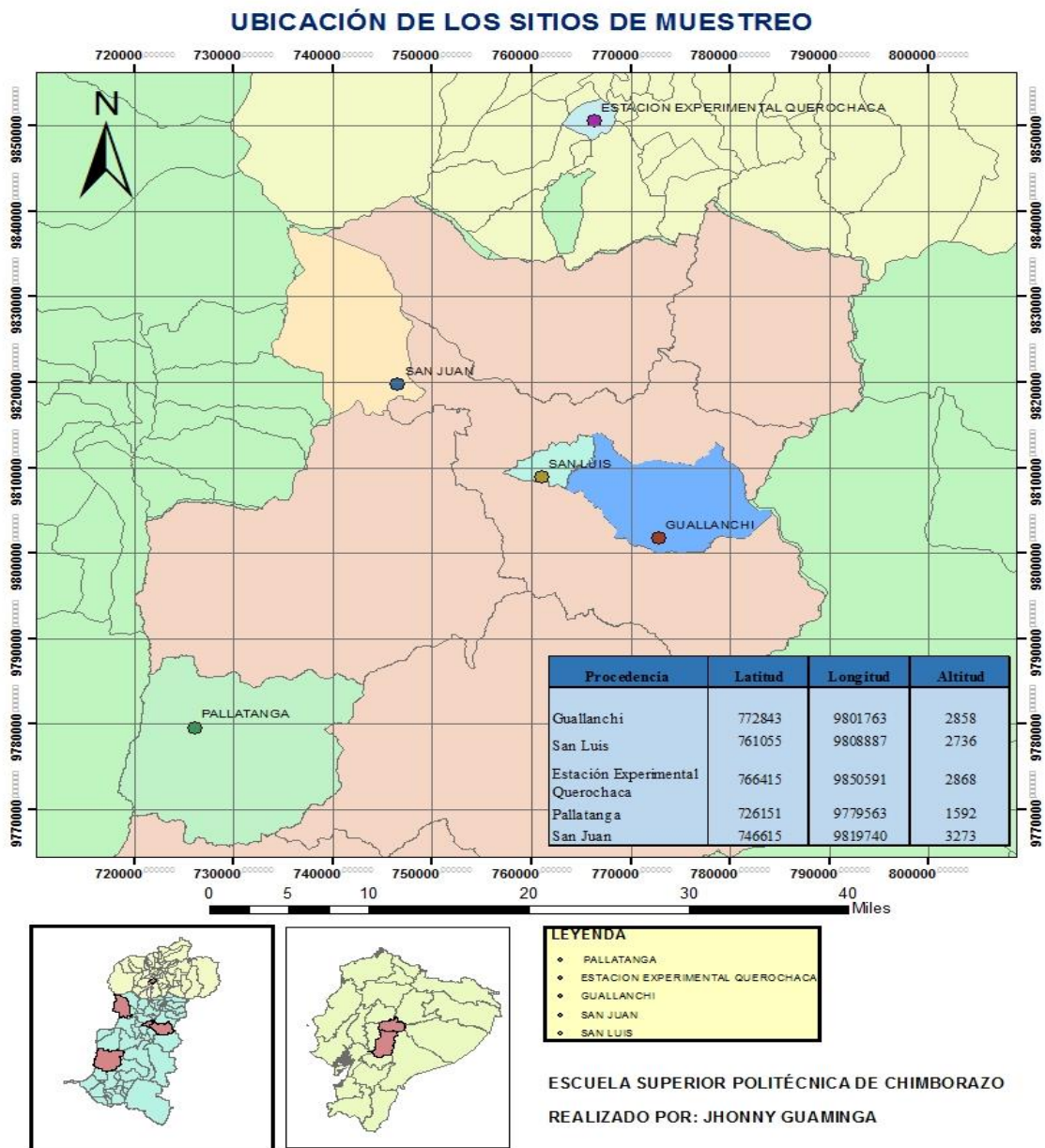
**Elaboración:** Guaminga, J. 2016

De acuerdo a la tabla propuesta por RIVERA (1994) para la Incidencia y severidad de *Meloidogyne* en el suelo, todas las muestras presentan un grado 4 cuya calificación es muy alta, sin embargo el número de agallas que oscila entre 30 – 60 indica un grado 3 calificación alta, la cantidad huevos y larvas oscila entre 300-600 indicando un grado 2 calificación como moderada, esto se puede explicar porque el cultivo es susceptible al ataque de nematodos en las primeras etapas, por lo que agallamiento es poco severo cuando el cultivo está instalado pudiendo observarse agallas pequeñas poco visibles a

simple vista. Se encontraron otros géneros de nematodos fitoparásitos tales como *Telotylenchus sp.*, *Tylenchus sp.*, *Aphelenchus sp.*

## 1.2. Muestreos de suelos

Durante el mes junio del 2015 se realizó 5 giras de campo, a zonas productoras de tomate riñón como San Luis, Pallatanga, Estación experimental Querochaca perteneciente a la Universidad Estatal de Ambato; al bosque nativo Guallanchi (BhMa), y a la parroquia de San Juan.



**Figura 3.** Ubicación geográfica de los sitios de muestreo para el aislamiento de hongos nativos

### 1.3. Determinación de pH, porcentaje de humedad (%H) y materia orgánica (%MO)

De acuerdo a la clasificación de pH según la USDA (1996) las muestras GU (Guallanchi), PA (Pallatanga) y SL (San Luis) se ubican dentro de rango Neutro; suelos SJ, UT (Universidad Técnica de Ambato) se interpretan como medianamente básico, de acuerdo a Cochrane, 1963; un pH alto perjudica enormemente el desarrollo de los hongos por la solubilidad de los metales y a pH bajos se afectan los sistemas enzimáticos, el ingreso de vitaminas esenciales, ácidos orgánicos y la toma de minerales.

La muestra de GU (Guallanchi) presentó el mayor contenido de humedad (49,5), el valor más bajo es de la muestra SJ (San Juan) (13,6). El contenido de materia orgánica de la muestra GU es la más alta (14,2)

**Cuadro 6.** Caracterización de las muestras de suelo

Código	Suelo	Textura	Manejo	pH	% H	% MO
GU	Guallanchi	Arcilloso	Bosque	6,52	49,5	14,2
PA	Pallatanga	Franco areno arcilloso	Cultivo de tomate riñón a campo abierto, manejo tradicional	6,58	18,6	4,1
SJ	San Juan	franco arenosos	Cultivo de papa, manejo tradicional	7,49	13,9	2,9
SL	San Luis	Franca o franco- arenosa	Cultivo de tomate riñón bajo invernadero, manejo tradicional	7,18	14,5	7,7
UT	Estación Experimental Querochaca	Franco arenoso	Cultivo de tomate riñón, manejo orgánico	7,67	17,6	4,1

**Elaboración:** Guaminga, J. 2016

### 1.4. Unidades formadoras de colonias (ufc)

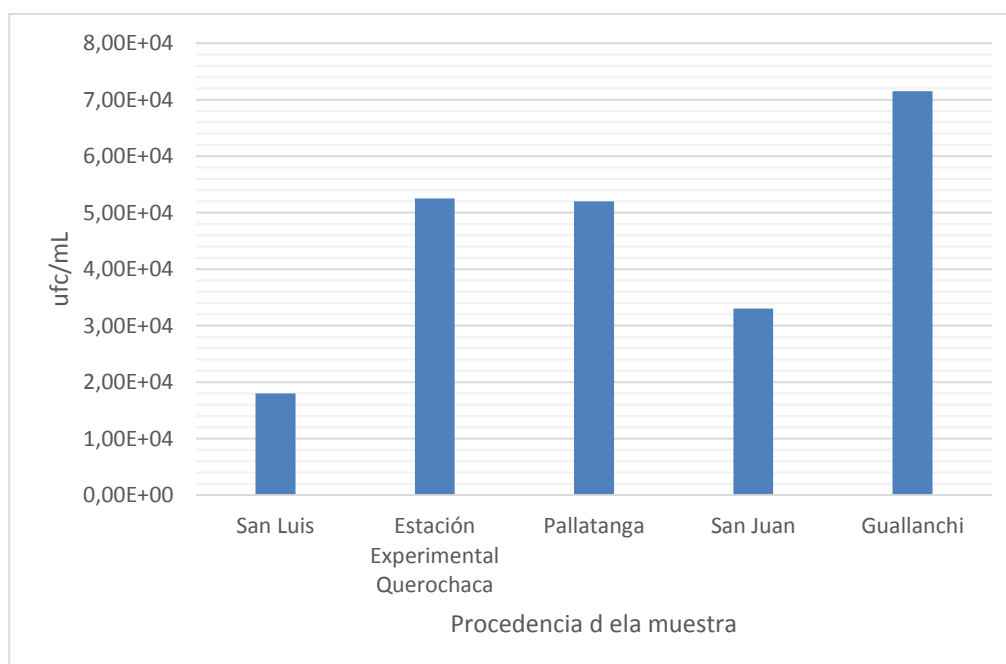
El valor más alto de ufc/mL fue de la muestra suelo proveniente de la región boscosa Guallanchi, siendo los sistemas de producción intensivos de tomate riñón Pallatanga y San Luis los que arrojaron los valores más bajos, probablemente la utilización de agroquímicos

en los sistemas de producción intensivos tienen efecto sobre la microbiota del suelo, afectando directamente las numerosas poblaciones de microorganismos nativos de interés biológico, microorganismos benéficos como hongos, bacterias presentes en la mayoría de los sistemas agrícolas, pueden sufrir alteraciones bioquímicas, disminuyendo su actividad como biofertilizantes y su efecto promotor del crecimiento de las plantas (Paoletti, 1999).

**Cuadro 7.** Unidades formadoras de colonias (ufc) dilución  $10^{-3}$

Suelo	Dilución $10^{-3}$			
	R1	R2	PROMEDIO	ufc/mL
Guallanchi	74	69	71	$7,1 \times 10^4$
Pallatanga	84	20	52	$5,2 \times 10^4$
San Juan	34	32	33	$3,3 \times 10^4$
San Luis	20	16	18	$1,8 \times 10^4$
Estación Experimental Querochaca	24	81	52	$5,2 \times 10^4$

**Elaboración:** Guaminga, J. 2016



**Figura 4.** Unidades formadoras de colonias (ufc/mL) dilución  $10^{-3}$

### 1.5. Aislamientos de microorganismos

De acuerdo al Cuadro 4 el número de aislamientos fue mayor en el suelo procedente de Guallanchi (GU), este valor probablemente, se debe a que la muestra correspondió a una área de bosque andino nativo con alto contenido de materia orgánica, donde se evidenció la existencia de una fuente y suministro de nutrimentos para los microorganismos del suelo, por lo que se deduce que hay mayor número y diversidad de microorganismos (Arenas, 1993).

A más de las cepas de hongos nativos se observó presencia de bacterias en la muestra proveniente de Guallanchi y la Estación Experimental Querochaca

**Cuadro 8.** Número de colonias aisladas por cada muestra de suelo

Suelo	Número de colonias aisladas		Géneros principales
	Hongos	Bacterias	
Guallanchi	10	2	<i>Alternaria</i> <i>Trichoderma</i> <i>Penicillium</i> <i>Cladosporium</i> <i>Cladophialophora</i>
Pallatanga	7	0	<i>Aspergillus</i>
San Juan	7	0	<i>Fusarium</i> <i>Mucor</i> <i>Aspergillus</i>
San Luis	10	0	<i>Mucor</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Acremonium</i>
Estación Experimental Querochaca	7	1	<i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i> <i>Botrytis</i>
Total	41	3	

**Elaboración:** Guaminga, J. 2016

### 1.6. Selección de aislamiento para pruebas de antagonismos

El análisis de varianza no paramétrico presentó diferencias altamente significativas ( $<0,0001$ ) entre los diferentes aislamientos, por lo que se procedió a ranquear los datos para seleccionar los mejores aislamientos. De acuerdo al rango los microorganismos nativos seleccionados fueron GUC, GUE, UTD, GUL, SLJ ya que fueron los mejores estadísticamente. Sin embargo también fueron escogidos los aislamientos PAD, SLB, SLE, SJA por ser mostraron similitud estadística a los mejores aislamientos.

**Cuadro 9.** Cepas seleccionadas para pruebas invitro

Procedencia	Código	Mediana	Rango
Guallanchi	GUC	128,83	A
Guallanchi	GUE	124,33	A
Guallanchi	GUL	123,83	A
Estación Experimental Querochaca	UTD	123,83	A
San Luis	SLJ	122,50	A
San Juan	SJA	114,50	AB
San Luis	SLE	113,67	AB
San Luis	SLB	109,50	AB
Pallatanga	PAD	108,83	AB

**Elaboración:** Guaminga, J. 2016

El uso de la técnica de nematodos cebo permite seleccionar aquellas cepas con cierto grado infectivo sobre nematodos, ya que dentro del suelo existen diversos microorganismos capaces de controlar directa o indirectamente a estos organismos. Se puede observar que existen más aislamientos con potencial nematófago en la muestra de suelo boscoso debido a que hubo mayor número y diversidad de microorganismos, el suelo de la Estación Experimental Querochaca presento solo un aislamiento a pesar de tener un manejo orgánico, tanto los suelos de San Luis, Pallatanga cuyo manejo es intensivo presentaron aislamientos lo que es importante ya que son cepas autóctonas del cultivo de tomate riñón.

## 2. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD IN VITRO

### 2.1. Análisis de varianza

El análisis de varianza mostro que existen diferencias significativas en el efecto de los tratamientos y el tiempo (<0,0001), pero no existe diferencias significativas en la interacción Tiempo x Tratamiento. Existe más bien un afecto aditivo (Cuadro 8)

**Cuadro 10.** Análisis de varianza para el porcentaje de nematodos inactivos por tratamiento

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Interpretación
Modelo.	17466,85	39	447,87	28,42	0,0001	
Tiempo	2696,59	3	898,86	57,04	0,0001	**
Tratamiento	14178,65	9	1575,41	99,98	0,0001	**
Tiempo*Tratamiento	591,62	27	21,91	1,39	0,1311	n.s
Error	1260,60	80	15,76			
Total	18727,45	119				
C de V	8,77					

**Elaboración:** Guaminga, J. 2016

n.s. no significativo \* significativo \*\* altamente significativo

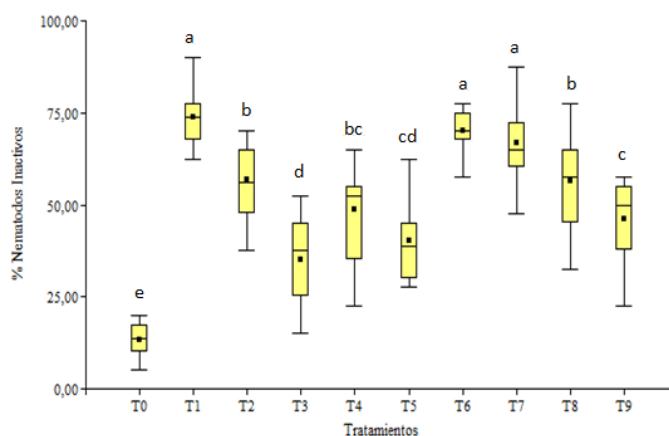
### 2.2. Prueba de Tukey al 5% para el porcentaje Nematodos inactivos (% nematodos inactivos)

La prueba de Tukey al 5% para porcentaje nematodos inactivos (Cuadro 9) presento 5 rangos, ubicándose dentro del primer rango, los tratamientos: con cepas de *Trichoderma* (T1) con una media de 73,96 con porcentaje de nematodos inactivos de 67-85%; con cepas de *Paecilomyces* (T6) cuya media fue de 70,21 con 64-73% de nematodos inactivos; con cepas de *Acremonium* (T7) con una media de 66,67 con 58-81% de nematodos inactivos.

**Cuadro 11.** Prueba de Tukey al 5% para el factor tratamiento. T0= Testigo, T1= *Trichoderma* 1, T2= Sin identificar, T3= *Cladophialophora*, T4= *Aspergillum*, T5= *Fusarium* 1; T6= *Paecilomyces*; T7= *Acremonium*, T8= *Trichoderma* 2, T9 = *Fusarium* 2.

Tratamiento	Medias	Rango
T1	73,96	a
T6	70,21	a
T7	66,67	a
T2	56,67	b
T8	56,46	b
T4	48,75	bc
T9	46,04	c
T5	40,21	cd
T3	35,00	d
T0	13,33	e

**Elaboración:** Guaminga, J. 2016



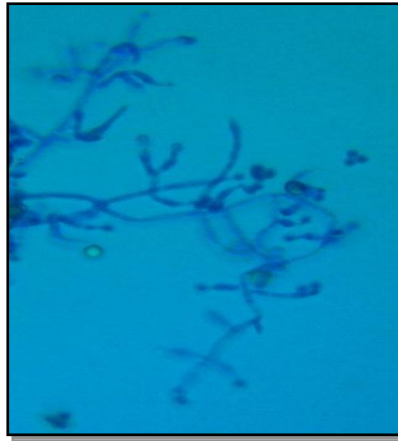
**Figura 5.** Porcentaje Nematodos inactivos por tratamiento

## Trichoderma

La cepa de *Trichoderma* presento un porcentaje de nematodos sin actividad a las 96 H del 85% por sus características antagonistas el genero *Trichoderma* es ampliamente usado en el control biológico, sus mecanismos de acción son diversos, entre ellos la competencia por los nutrientes, el enrollamiento alrededor de las hifas del hospedante y la producción de enzimas hidrolíticas glucanasas, quitinasas, y proteasas, mismas que pueden degradar la cutícula (Kullnig et al., 2000).



Sumado a lo anterior *Trichoderma* produce diferentes antibióticos volátiles y no volátiles; mismos que tienen la capacidad de parasitar, controlar y destruir los fitonematodos (Baños, 2000). De acuerdo a Pérez (2000) el genero *Trichoderma* spp. es un biorregulador efectivo contra nematodos del género *Meloidogyne* por medio de sus toxinas e hifas.



**Figura 6.** Observación microscópica (40X) *Trichoderma*

### ***Paecylomices***

El aislamiento nativo *Paecylomices* obtuvo un porcentaje de inactividad de nematodos a las 96h de 73% uno de los mecanismos de acción de *Paecylomices* es el micoparasitismo, a través de la producción de enzimas quitinolíticas pueden destruir la pared de los huevos y la cutícula de juveniles (Xiujuan et ál. 2000).

Jatala; (1985). reportado a *Paecylomices* como agente importante de control ya que infecta huevos y hembras de nematodos del género *Meloidogyne* spp. causando deformaciones, destrucción de huevos y limitando la eclosión del segundo estado juvenil (J2); a la vez se ha señalado que a pH ligeramente ácido, produce toxinas que afectan el sistema nervioso de los nematodos (Paecisav, 1997).

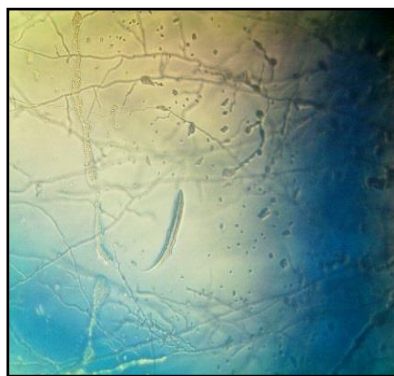


**Figura 7.** Observación microscopica (40X) *Paecilomyces*

### ***Acremonium***

La cepa de *Acremonium* con un 81% de inactividad de nematodos de acuerdo a Mendoza y Valero, 2009 uno de los mecanismos de acción para el control biológico son las estructuras pegantes mismas que se adhieren al cuerpo del nematodo, cepas de *Acremonium* comparte nichos ecológicos con nematodos fitoparásitos y han sido aisladas de masas de huevos y larvas (Goswami et al.2008). el mecanismo de acción de *Acremonium* para el control es por micoparasitismo de huevos y larvas sumado a la producción de toxinas.

A través de la producción de quitinasas destruyen la estructura externa del nematodo permitiendo la colonización del mismo, las toxinas inhiben la eclosión de huevos, impidiendo que el nematodo llegue al estadio infectivo J2. (Goswami& Singh2004)



**Figura 8.** Observacion microscopica (10X) *Acremonium*

## VI. CONCLUSIONES

- A través de la técnica de nematodos cebo se estableció nueve cepas de hongos nativos con características nematófagas, como *Trichoderma* (2 cepas), *Cladophialophora*, *Aspergillum*, *Fusarium* (2 cepas), *Paecilomyces*, *Acremonium* y una cepa sin identificar
- En condiciones en vitro a una concentración de  $10^8$  esporas de hongos se obtuvieron tres cepas correspondientes a *Trichoderma*, *Paecilomyces* y *Acremonium*, las mismas que presentaban un porcentaje de inactividad de nematodos 73,96%, 70,21% y 66,67% respectivamente, siendo los aislamientos nativos con mejor potencial nematófagos frente a estadios juveniles del nematodo agallador *Meloidogyne*.
- Tanto *Paecilomyces* como *Acremonium* presentaron un mecanismo de acción a través de micoparasitismo. Las conidias se sitúan sobre el cuerpo de los nematodos fitoparásitos y por acción de enzimas destruyen su cutícula y proliferaban en el interior del nematodo. Por otro parte la cepa *Trichoderma*, no se observó estructuras en el cuerpo de los nematodos, pudiendo suponerse que la acción del control se debió a micotoxinas.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Probar diferentes sustratos para multiplicación de los hongos con características nematófagas para su utilización en campo.
- Realizar pruebas de campo con las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones y en distintas épocas de aplicación.
- Realizar la identificación molecular de tres cepas seleccionadas.
- Hacer la bioprospección en otros agroecosistemas de importancia económica susceptibles al ataque de nematodos fitoparásitos, así como en zonas boscosas.
- Analizar la dinámica poblacional del nematodo agallador *Meloidogyne* en el cultivo de tomate riñón (*Lycopersicon sculentum* L.) en la parroquia San Luis.
- Determinar el rango de hospederos del nematodo agallador *Meloidogyne* en malezas presentes en el cultivo de tomate riñón (*Lycopersicon sculentum* L.) en la parroquia San Luis.

## VIII. RESUMEN

La presente investigación propone: obtener aislamientos de hongos para el manejo de nematodos fitoparásitos de la rizósfera del tomate riñón (*Lycopersicon esculentum* L); a partir de cinco agro ecosistemas de las provincias de Chimborazo (4 muestras) y Tungurahua (1 muestra) realizado en el laboratorio de biología de la Facultad de Recursos Naturales. Mediante el método de dilución seriada se obtuvieron 41 aislamientos, las cepas aisladas se confrontaron con una población alta de nematodos (90 individuos) del género *Passalurus sp.*, trascurridas 96 horas se contabilizó los nematodos parasitados o inactivos, los datos obtenidos fueron analizados a través de la Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, arrojando diferencias altamente significativas ( $<0,0001$ ), de acuerdo al rango, los microorganismos nativos seleccionados para las pruebas de patogenicidad son GUC, GUE, UTD, GUL, SLJ, sin embargo también se probaron las cepas PAD, SLB, SLE, SJA por ser estadísticamente similares a los mejores aislamientos. Se utilizó un DCA con tres repeticiones para las pruebas de patogenicidad, el hongo con una concentración de  $10^8$  esporas y 40 nematodos del género *Meloidogyne* por cada repetición. Se registró el porcentaje de inactividad de nematodos a las 24, 48, 72 y 96 horas, los datos obtenidos se sometieron a una transformación Bliss, el análisis de varianza arrojó diferencias altamente significativas ( $<0,0001$ ) para tratamientos y tiempo, no se presentó significancia para la interacción Tratamiento x Tiempo. La prueba de Tukey al 5% para el factor tratamiento mostro que en el rango a se ubican los tratamientos T1: GUC (*Trichoderma*, 73.96%), T6: SLB (*Paecylomices*, 70.21%) y T7: SLE (*Acremonium*, 66.67%). Siendo los aislamientos que presentaban el mayor porcentaje de inactividad de nematodos fitoparásitos del género *Meloidogyne*. Se recomienda probar diferentes sustratos para la multiplicación masiva de estos hongos y su aplicación en campo.

**Palabras claves:** nematodos fitoparásitos, tomate riñón, nematodos parasitados o inactivos.

## **IX. SUMMARY**

This research proposes: getting isolates fungus for handling of nematodes fitoparasites of the tomato rhizosphere, (*Lycopersicon sculentum* L.); from five agro ecosystems in the provinces of Chimborazo (4 samples) and Tungurahua (1 sample) conducted in the Biology laboratory, Faculty of Natural Resources. Through the serial dilution method was obtained 41 isolates, the isolated strains were confronted with a high population of nematodes (90 individuals) of the genus *Passalurus* sp. After 96 hours the parasitized nematodes or inactive were accounted for, the obtained data were analyzed through the non-parametric test of Kruskal-Wallis test, they showed highly significant differences (<0.0001) according to rank, the native micro-organisms selected for pathogenicity test are GUC, GUE, UTD, GUL and SLJ. However the strains also were tested such as: PAD, SLB, SLE, SJA, by being statistically similar to the best isolates. It was used a DCA with three replicates for pathogenicity test, the fungus with a concentration of  $10^8$  spores and 40 nematodes of the *Meloidogyne* genus for each repetition. It was registered the percentage of inactivity of nematode at 24, 48, 72 and 96 hours, the obtained data were subjected to a transformation Bliss the analysis of variance threw highly significant differences (<0,0001) for the treatment by time. Significance for treatment interaction by time wasn't presented. The Tukey test at 5% for the treatment factor showed that in rank a, the T1 treatments were located: GUC (*Trichoderma*, 73,96%), T6: SLB (*Paecylomyces*, 70,21%) and T7: SLE (*Acremonium*, 66,67%). These were the isolates that present the highest inactivity percentage of the nematodes fito parasitized *Meloidogyne* gender. It is recommended testing different substrates for mass multiplication of these fungi and its application in the field.

**Keywords:** nematodes fito parasitized, tomato, parasitized nematodes or inactive.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Agnenin O. (2011). Biological control of plant parasitic nematodes: Prospects and Challenges for the Poor Africa Farmer. *Plant Protection Science* 47(2),62-67.
2. Agrios, G. N. (1988). *Fitopatología*. Trad. del inglés por Manuel Guzmán Ortiz. Limusa. México. p. 756.
3. Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. (5ta Ed). Elsevier Academic Press, New York.
4. Araya, M. (2003). Situación actual del manejo de nematodos en banano (*Musa AAA*) y plátano (*Musa AAB*) en el trópico americano. pp. 79-102. En: Rivas, G. & Rosales, F. (eds.). *Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos*. INIBAP, Francia.
5. Arenas, R. (1993). *Micología médica ilustrada. clínica, laboratorio y terapéutica*. (1ra Ed). México D.F: McGraw Hill. p. 397.
6. Banal, R., & Wailand, D. (1988). Sabbath Evaluation of some agro industrial waste for mass propagation of the nematodes parasitic fungus *Paecilomyces lilacinus*. Neatly Meidt. pp. 16: 135 – 138.
7. Baños. (2000). Efecto de enmiendas orgánicas y trichodermaspp. en el manejo de *meloidogyne* spp. *Rev. Bras. de Agroecología.*; 5(2), 224 –233.
8. Barrón, L. (1977). *The nematode destroying fungi*. Lancaster, Pennsylvania, USA. Lancaster Press, Inc. p. 14 0.
9. Bates, G. (1983). *Determination of pH*, Wiley, New York.
10. Bongers, T. (1999). The Maturity Index, the evolution of nematode life-history traits, adaptive radiation, and cp-scaling. *Plant and Soil* 212:13-22.
11. Campos, R., Gómez, M., Escuer, M., Cuadra, L., Barrios, L., & Gutiérrez, C. (2008). Diversity, occurrence, and life characteristics of natural entomopathogenic nematode populations from La Rioja (Northern Spain) under different agricultural management and their relationships with soil factors. *Soil Biology and Biochemistry*. 40:1474-1484.
12. Cochrane, V. (1963). *Physiology of Fungi*. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York. p. 524.
13. Davis, E. L., Hussey, R. S., Baum, T. J. Bakker, J., & Schots, A. (2000). Nematode parasitism genes. *Annual Review of Phytopatology*, pp. 38, 365-396.

14. Eguiguren, R., & Defas, M. (1992). Principales Fitonemátodos en el Ecuador Descripción Biología y Combate, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Quito - Ecuador, Boletín Técnico N°21: 1, 14, 15.
15. Eisenback, J., Hirschmann, H., Sasser, J., & Triantaphyllou, A. (1983). Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* especies), con una clave pictórica. Traducida del Inglés por Carlos Sosa-Moss. International *meloidogyne* project. Raleigh, North Carolina, USA. p. 48.
16. Ferris, H., Bongers, T., & DE GOEDE, R.G.M. (2001). A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology* 18:13-29.
17. Gheysen, G., & Jones, T. (2006). Molecular aspects of plant-nematode interactions. In: *Plant nematology*. Perry, R. y Moens, M. (Eds). CABI, UK. pp. 234-254.
18. Goswami B, Singh S. (2004). Fungal bioagents for management of root-knot nematode in tomato. *Pestic Res J.* 16:9-12.
19. Goswami, J., Pandey R, K., & Tewari J. (2008). Management of root knot nematode on tomato through application of fungal antagonists, *Acremonium strictum* and *Trichoderma harzianum*. *J Environ Sci Health.* pp.43:237-240.
20. Gowen, S., Quénehervé, P., & Fogain, R. (2005). Cap. 16: Nematodes Parasites of Bananas and Plantains. pp. 611-643.
21. Gutiérrez, M., Sánchez, T., Arístides, L., & Hernández, E. (2003). Evaluación del efecto nematicida de cepas de *Bacillus spp.* Consultado el 1 de junio del 2015; Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209118162009.pdf>
22. Guzmán, O., Zapata, J., & Estrada, B. (2012). Principales nematodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. Consultado el 20 de mayo del 2015. Disponible en [http://www.researchgate.net/publication/271203100\\_PRINCIPALES\\_NEMATODOS\\_FITOPARSITOS\\_Y\\_SNTOMAS\\_OCACIONADOS\\_EN\\_CULTIVOS\\_DE\\_IMPORTANCIA\\_ECONMICA](http://www.researchgate.net/publication/271203100_PRINCIPALES_NEMATODOS_FITOPARSITOS_Y_SNTOMAS_OCACIONADOS_EN_CULTIVOS_DE_IMPORTANCIA_ECONMICA)
23. Guzmán-Piedrahita, O. A., & Castaño-Zapata, J. (2004). Reconocimiento de nematodos fitopatógenos en plátanos Dominico Hartón (*Musa AAB Simmonds*), Africa, FHIA-20 y FHIA-21 en la granja Montelindo, Municipio de Palestina (Caldas), Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.* 28(107):295-301.



24. Hugot, J.P., Baujard, P., & Morand, S. (2001). Biodiversity on helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*. 3:199-208.
25. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. (1982). Informe Técnico de la Sección de Hematología de la Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito. p. 75
26. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. (2003). Control biológico del nematodo agallador *Meloidogyne spp.* con la bacteria *Pasteuria penetrans* en campos de producción" Documento electrónico: Consultado el 20 de mayo del 2015. Disponible en [http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Control\\_biologico\\_nematodo\\_agallador\\_Meloidogyne\\_spp.pdf](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Control_biologico_nematodo_agallador_Meloidogyne_spp.pdf)
27. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2014). Área cultivada de tomate riñón en el Ecuador. Documento electrónico: Consultado el 13 de abril del 2015. Disponible en <http://ambar.utpl.edu.ec/es/dataset/estadisticas-agropecuarias-de-superficie-y-produccion-continua-en-ecuador-en-2014/resource/80ddb910-0ac4-48c0-93c2-aae78f3c454e>
28. Jatala, P. (1985). Biological control of nematodes. pp. 303-308. In: Sasser, J. N. & C. C. Carter (eds.). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Volume 1. North Carolina State.
29. Jones J. T., Haegeman A, Danchin, J., Gaur H S., Helder, J., Jones, K, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius J E, Wesemael W M L., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14(9), 946-961.
30. Kerry B. R. (2000). Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 38:423-441
31. Khan T., Shadab S., Afroz R., Abdul M., Aziz A.M., & Farooqui M. (2011). Study of Suppressive Effect of Biological agent Fungus, Natural Organic Compound and Carbofuran on Root-knot Nematode of Tomato (*lycopersiconesculentum*). *Journal of Microbiology and Biotechnology* 1(1),7-11
32. Kullnig, C. L., Mach, M., & Lorito, C. P. (2000). Kubicek: «Enzyme Diffusion from *Trichodermaatroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctoniasolani*Is a Prerequisite for Triggering of *TrichodermaEch 42* Gene Expression Before Mycoparasitic Contact», *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2232- 2234, EE.UU., 2000.

33. Li, T.F. Zhang, K. Q., & Liu, X.Z. (2000)..Taxonomy of nematophagous fungi. Chinese Science and Technical Publishing, Beijing. 18 p
34. Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. (2005). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. (2da Ed.) CABI Publishing.
35. Magill, C., & Starr, J. L. (2005). Laser capture microdissection and realtime PCR for measuring RNA in giant cells induced by *M. javanica*. Journal of Nematology 37(3),308- 312.
36. Manzanilla-López, R., Evans, K. & Bridge, J. (2004). Plant diseases caused by nematodes. Capítulo 13. pp. 637-716. In: Chen, Z.X., Chen, S.Y. & Dickson, D.W. (eds.). Nematology: Advances and perspectives. Volume II: Nematode management and utilization. cab international.
37. Mendoza, P., Valero, R. (2009). “Uso de hongos nematófagos: una herramienta biotecnológica para el control de nematodos parásitos del ganado”. Consultado el 18 de mayo del 2015. Disponible en [http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3142/Follet\\_oTecnicoN7.pdf?sequence=1](http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3142/Follet_oTecnicoN7.pdf?sequence=1)
38. Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D.L., Dennijs, L., Hockland, S. & Maafi , Z. T. (2011) Current nematode threats to world agriculture. In: Genomics and Molecular Genetics of Plant–Nematode Interactions (Jones, J.T., Gheysen, G. and Fenoll, C., eds), pp. 21–44. Heidelberg: Springer.
39. Orion, D., Kritzman, G., Meyer, S., Erbe, E. F. & Chitwood, D. J. (2001). A Role of the Gelatinus matrix in the resistance of Root- Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp) Eggs to Microorganisms. Journal of Nematology. 33(4) ,203.
40. Paoletti, M. G. (1999). The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. Agriculture, Ecosystems and Environment. Italia. 74 (1-3), 137-155.
41. Peraza, W. (2010) Nematodos fitoparásitos asociados a cultivos agrícolas de costa rica. Consultado el 20 de mayo del 2015. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/195399234/Manual-Cultivos-Final#scribd>
42. Pérez J. (2000). Trichoderma: alternativa para el control biológico de nematodos en el marco de una agricultura sostenible. Rev. Fitosanidad. 2006; 10(2),165.
43. Perry, R., Moens, M. & Starr, J. (2009). Root knot nematodes. CAB International, London.
44. Perry, R., Moens, M. (2006). Plant nematology. CAB International, Lóndres.
45. PLABI. (2003). Formulación de esporas en latencia del hongo *Paecilomyces lilacinus*.

46. Puedmag, J. Y, & Hernández, M. (2007). Eficiencia de nematocidas biológicos en el control de *Meloidogyne incognita* en tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo invernadero, en Socapamba Imbabura. Documento electrónico: Consultado el 20 de mayo del 2015. Disponible en <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/178/1/03%20AGP%2032%20ARTICULO%20CIENTIFICO.pdf>
47. Ramírez G. R. M., Luna M. B., Mejía CH. A., Velázquez M. O., Tsuzuki R. G., Vierna G. L., & Müggenburg I. (1992). Manual de prácticas de microbiología general. Laboratorio de microbiología.
48. Revelo, J. (2002). Nematodos parásitos de las plantas. Apuntes de la Cátedra de Fitopatología. Quito.
49. Revelo, J. (2006). Avances del proyecto “Estudio epidemiológico del “nematodo del rosario” o “falso nematodo del nudo” (*Nacobbus* sp.) en el cultivo de tomate de mesa en el valle del Chota para optimizar su control”. INIAP-UTN-SENACYT. Quito. p. 28.
50. Roman, J., & Acosta, N. (1984). NEMÁTODOS DIAGNOSTIC Y COMBATE. Consultado el 20 de mayo del 2015. Disponible en <http://academic.uprm.edu/ofarrill/HTMLobj234/NematodosDiagnosticoyCombate.pdf>
51. Seinhorst, J. W. (1981). Water consumption of plants attacked by nematodes and mechanisms of growth reduction. *Nematologica*. 27:34-51.
52. Sikora, R.A. & Bridge, J. (2007). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CABI Publishing.
53. Soto N., De Oliveira J., Vega R., Montero D., Vergas B., Hernández R., & Orozco C. (2011). In-vitropredatory activity of nematophagous fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes. *Revista de Biología Tropical* 59(1).37-52.
54. Steubing, L., Godoy, R., & Alberdi, M. (2001). Métodos de ecología vegetal (Primera edición ed.). Santiago de Chile, Chile: Universitaria.
55. Talavera, M. (2003) Manual de nematología agrícola. Consultado el 1 de junio del 2015; Disponible en [https://www.academia.edu/172270/Iniciacion\\_a\\_la\\_Nematologia](https://www.academia.edu/172270/Iniciacion_a_la_Nematologia)
56. Triviño, C. (1996). Nematodos Fitoparásitos de la soya en Ecuador, INIAP, Quito, Ecuador. *Boletín técnico* N° 32: 107 – 114.

57. Triviño, C. (2004). Control biológico de *Meloidogyne spp.* con la bacteria *Pasteuria penetrans* en campos de producción. Boletín técnico No. 98. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Boliche. Guayaquil - Ecuador. p. 46.
58. Triviño, C., GOWEN, S., TRUDGILL, D., & FARGETTE, M. (1998). Densidades poblacionales de nemátodos fitoparásitos en campos hortícolas del Ecuador. *Nematrópica*. 28(2): 148
59. Valencia, I. E. & Hernández, A. (2002). Muestreo de suelos, preparación de muestras y guía de campo. UNAM. Mexico. p. 131.
60. Willard H. H., Merrit L. L., & Dean J. A. (1974). Instrumental methods of analysis. (5ta Ed) Van Nostrand.
61. Wyborn, C., Priest, D., & Duddington, C. (1969). Selective technique for the determination of nematophagous fungi in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1,101–102.
62. Xiujuan Y., Xiujuan H., Liang Z. (2000). Chitinasas of *Paecilomyces lilacinus* and studies on the biocontrol of plant parasitic nematodes. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* 22(1),86-89.
63. Yeates, G. W. (2003). Nematodes as soil indicator: functional and biodiversity aspects. *Biology and Fertility of Soils*. Inglaterra. 37:199-210.

## **XI. ANEXOS**

### **Anexo 1. Medios de cultivo**

#### **PDA**

PDA 39 g

Agua destilada 1000 mL

#### **Agar maíz $\frac{1}{4}$**

Agar maíz 4.25 g

Agar agar 12,75 g


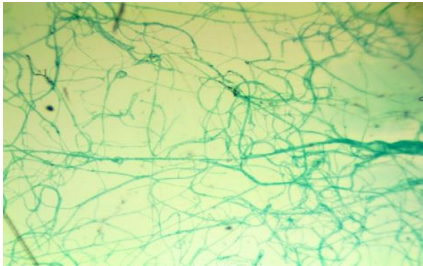



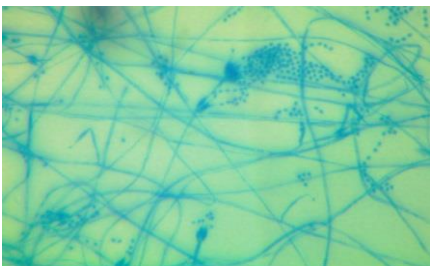
Agua destilada 1000 mL


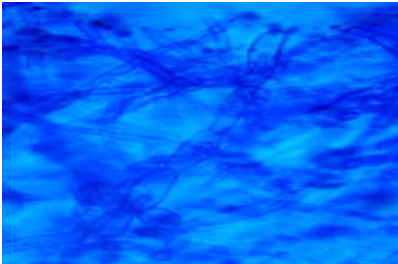
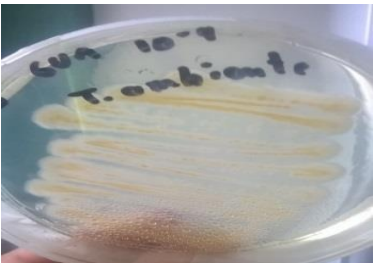
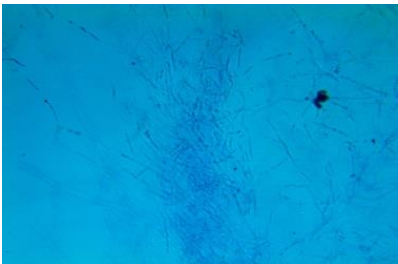


#### **Antibióticos**

Cloranfenicol (1 capsula/500 mL)


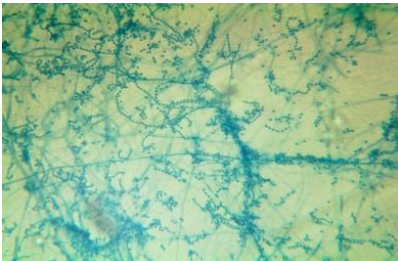

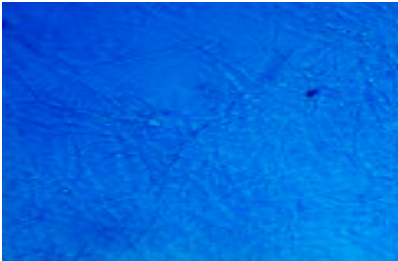

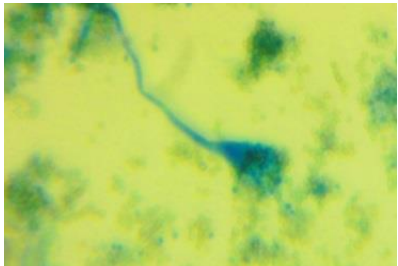
## Anexo 2. Microorganismos aislados del suelo



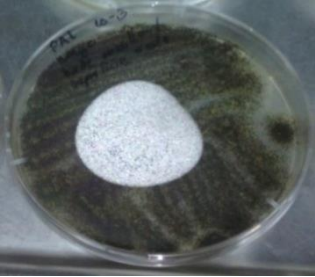
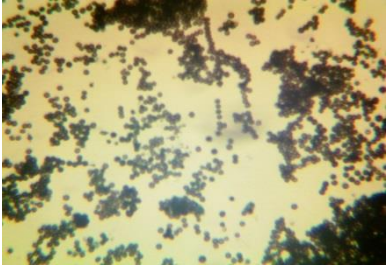

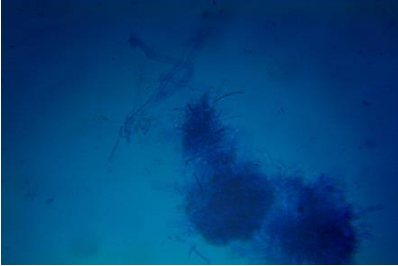
Características	
Macroscópicas	Microscópicas
<p><b>Suelo:</b> Guallanchi</p>  <p><b>Codificación:</b> GUA            Colonia en medio de cultivo PDA a los 4 días, coloración crema en los bordes y marrón en el centro, textura algodonosa.</p>	<p><b>Temperatura de incubación:</b> 22°C</p>  <p><b>Género:</b> Alternaria            Azul de lactofenol (40X)            Conidióforos simples tabicados, en su extremo se forman los Conidios con 2 a 3 septos transversales.</p>
 <p><b>Codificación:</b> GUB            Colonia en medio de cultivo PDA a los 4 días, textura aterciopelada, coloración crema, bordes blanquecinos, cambia la coloración del medio.</p>	 <p>Azul de lactofenol 40X            Hifas sin estructuras características.</p>
	




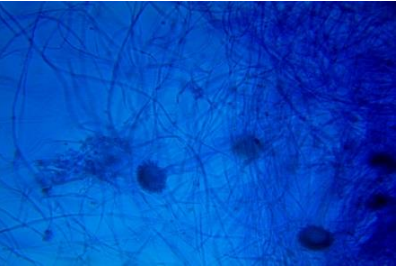
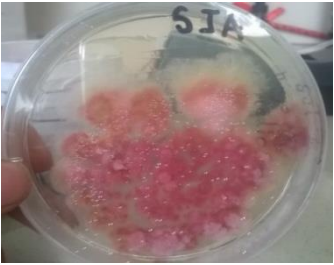
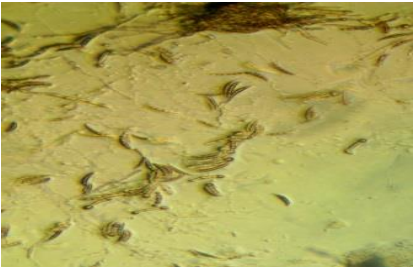
<p><b>Codificación:</b> GUC</p> <p>Colonias en medio de cultivo PDA a los 4 días, micelio de coloración blanquecina que se va tornando verdosa con el tiempo de textura aterciopelada.</p>	<p><b>Género:</b> Trichoderma</p> <p>Azul de lactofenol 40X</p> <p>Micelio con hifas septadas, conidióforo situados a cada lado de la hifa, fiálides delgadas en cuyo extremo están los conidios. El sistema de ramificación es piramidal.</p>
 <p><b>Codificación:</b> GUE</p> <p>Cultivo en medio de cultivo PDA a los 4 días, textura afelpada de coloración blanquecina, crecimiento abundante.</p>	 <p>Azul de lactofenol 10X</p> <p>Hifas sin estructuras para reconocimiento</p>
 <p><b>Codificación:</b> GUF</p> <p>Colonia en medio del cultivo PDA a los 4 días, textura algodonosa, centro de coloración café cuyo borde es crema.</p>	 <p>Azul de lactofenol 40X</p> <p>Hifas sin estructuras características</p>
	

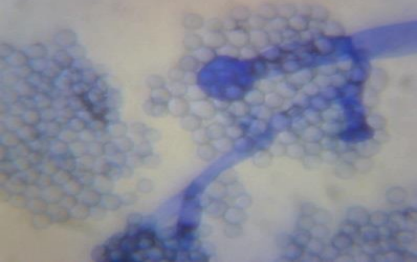
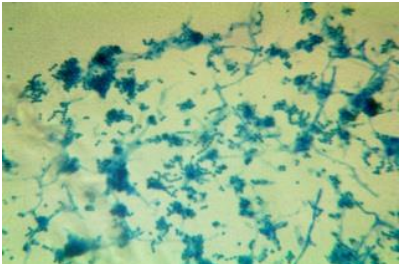
<p><b>Codificación:</b> GUG</p> <p>Colonia en PDA a los 4 días, coloración crema en el centro, blanquecina en el borde, textura aterciopelada.</p>	<p><b>Género:</b> Penicillium</p> <p>Azul de lactofenol (40x)</p> <p>Hifas septadas, Conidióforos rectos, fiálides en forma de frasco sobre las que se ubican las conidias esféricas dispuestas en cadena.</p>
 <p><b>Codificación:</b> GUI</p> <p>Colonia en agar PDA a los 4 días, textura aterciopelada, coloración marrón y crema en los bordes.</p>	 <p><b>Género:</b> Cladosporium</p> <p>Azul de lactofenol (40X)</p> <p>Conidióforos con conidios ovoides que se agrupan formando ramas</p>
 <p><b>Codificación:</b> GUJ</p> <p>Colonia en PDA a los 4 días coloración crema con bordes blanquecinos, textura afelpada.</p>	 <p>Azul de lactofenol 40X</p> <p>Hifas sin estructuras características</p>
	


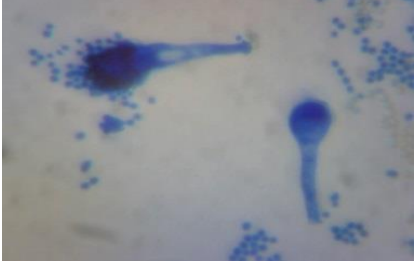


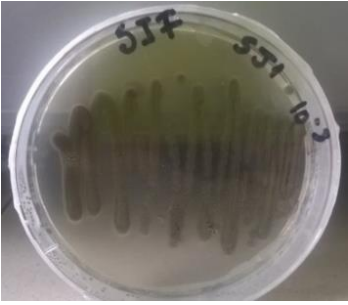
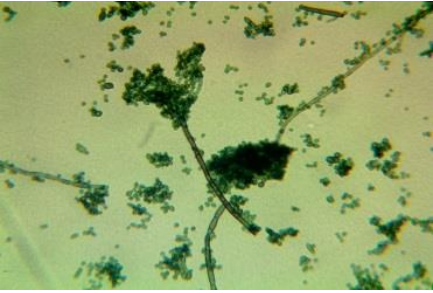


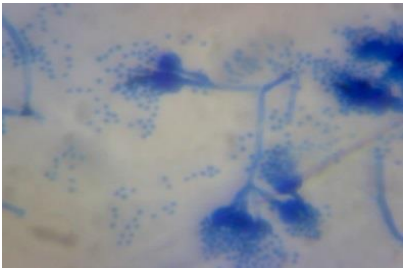

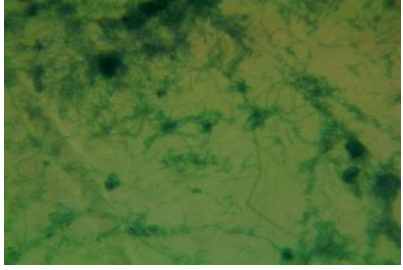
<p><b>Codificación:</b> GUK</p> <p>Colonia en medio de cultivo PDA a los 4 días de coloración marrón con bordes de color crema, textura afelpada.</p>	<p>Azul de lactofenol (40X)</p> <p>hifas sin estructuras características</p>
 <p><b>Codificación:</b> GUL</p> <p>Colonia en PDA a los 4 días de coloración anaranjada en el centro, borde crema, textura aterciopelada.</p>	 <p><b>Género:</b> Cladophialophora</p> <p>Azul de lactofenol (40X)</p> <p>Hifas septadas de las cuales salen directamente los conidios, los conidios están unidos formando cadenas.</p>
<p><b>Suelo:</b> Pallatanga</p>	<p><b>Temperatura de incubación:</b> 28°C</p>
 <p><b>Codificación:</b> PAA</p> <p>Colonia en medio de cultivo PDA a los 3 días, textura afelpada, coloración crema en el centro con bordes blanquecinos.</p>	 <p>Azul de lactofenol (40X)</p> <p>Hifas sin estructuras características</p>
	 <p><b>Género:</b> Aspergillus</p>


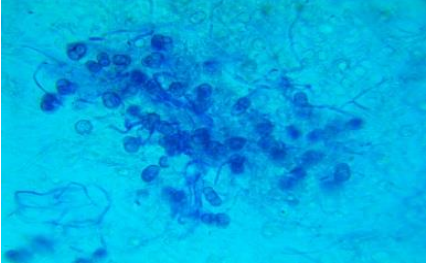

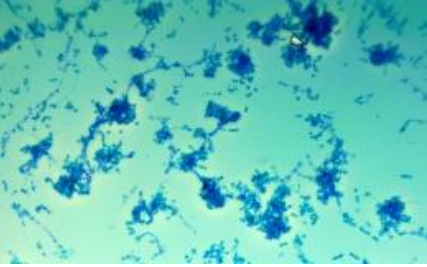

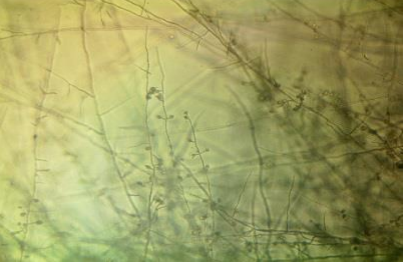
<p><b>Codificación:</b> PAB</p> <p>Colonia en medio PDA a los 3 días coloración negruzca, bordes blanquecinos.</p>	<p>Azul de lactofenol (40X)</p> <p>Hifas tabicadas con Conidióforo Recto, fiálides que nacen de la métula, conidios redondas.</p>
 <p><b>Codificación:</b> PAC</p> <p>Colonia en medio PDA a los 3 días coloración blanquecina textura algodonosa.</p>	 <p>Azul de lactofenol 40X</p> <p>Hifas sin estructuras características</p>
 <p><b>Codificación:</b> PAD</p> <p>Colonia en medio de cultivo PDA a los 3 días, crecimiento abundante coloración amarillenta al inicio, posteriormente adquiere una coloración negruzca.</p>	 <p><b>Género:</b> Aspergillus</p> <p>Azul de lactofenol (40X)</p> <p>Hifas tabicadas con Conidióforo Recto, fiálides que nacen de la métula, conidios redondas.</p>
	


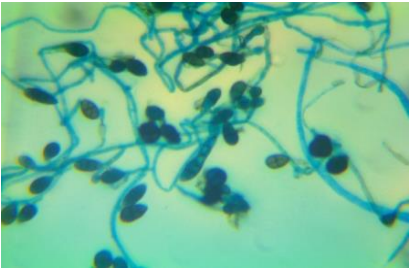

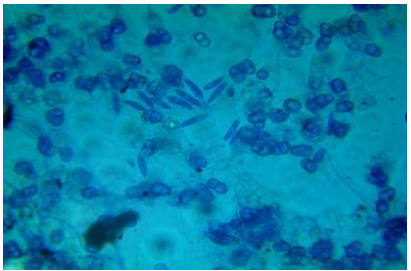

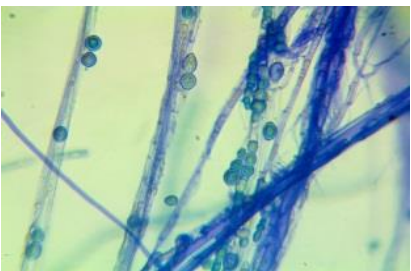
<p><b>Codificación:</b> PAE</p> <p>Micelio en medio PDA a los 3 días, textura aterciopelada, inicialmente blanquecina con el tiempo se torna oscura.</p>	<p>Azul de lactofenol 40X</p> <p>Hifas sin estructuras características</p>
 <p><b>Codificación:</b> PAF</p> <p>Colonia en medio de cultivo PDA a los 3 días, textura aterciopelada de coloración verdosa y blanquecina en los bordes.</p>	 <p>Azul de lactofenol 40X</p> <p>Hifas sin estructuras características</p>
 <p><b>Codificación:</b> PAG</p> <p>Colonia en PDA a los 3 días, textura algodonosa, coloración blanquecina</p>	 <p><b>Género:</b> Aspergillus</p> <p>Azul de lactofenol (40X)</p> <p>Hifas tabicadas con Conidióforo Recto, fiálides que nacen de la métula, conidios redondas.</p>
<p><b>SUELO:</b> San Juan</p>	<p><b>Temperatura de incubación:</b> 22°C</p>
	

<p><b>Codificación:</b> SJA</p> <p>Colonia en medio de cultivo PDA, textura afelpada, coloración rosa en el centro con bordes blanquecinos</p>	<p><b>Género:</b> Fusarium</p> <p>Azul de lactofenol (10X)</p> <p>Macroconidias con 3 a 5 septos de tamaño variable con forma elipsoidal</p>
<p><b>Codificación:</b> SJB</p> <p>Crecimiento en medio de cultivo PDA a los 3 días, crecimiento aéreo abundante ocupa toda la caja Petri, micelio de color crema con puntuaciones negras.</p>	 <p><b>Género:</b> Mucor</p> <p>Azul de lactofenol 40X</p> <p>Esporangioforo ramificado con incrustaciones, esporangio globoso con esporangiosporas esféricas.</p>
<p><b>Codificación:</b> SJC</p> <p>Crecimiento en medio de cultivo PDA textura afelpada, de coloración crema.</p>	 <p><b>Género:</b> Penicillium</p> <p>Azul de lactofenol (40x)</p> <p>Hifas septadas, Conidióforos rectos, fiálides en forma de frasco sobre las que se ubican las conidias esféricas dispuestas en cadena.</p>


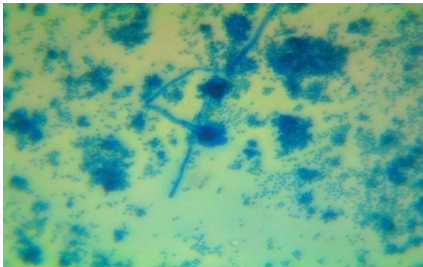

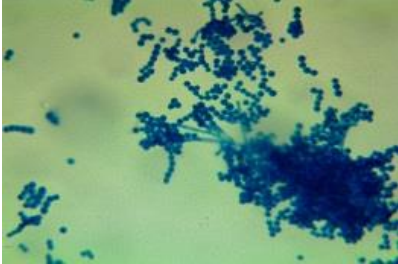


 <p><b>Codificación:</b> SJD</p> <p>Micelio en medio de cultivo PDA, textura aterciopelada, coloración verde oliva, con bordes blanquecinos.</p>	 <p><b>Género:</b> Aspergillus</p> <p>Azul de lactofenol (40X)</p> <p>Hifas tabicadas con Conidióforo Recto, fiálides que nacen de la métula, conidios redondas.</p>
 <p><b>Codificación:</b> SJE</p> <p>Colonia en medio de cultivo PDA de textura aterciopelada, centro marrón, con bordes blancaquesinos</p>	 <p><b>Género:</b> Aspergillus</p> <p>Azul de lactofenol (40X)</p> <p>Hifas tabicadas con Conidióforo Recto, fiálides que nacen de la métula, conidios</p>
 <p><b>Codificación:</b> SJF</p> <p>Colonia en medio PDA de coloración marrón cuyos bordes son blancos, textura aterciopelada</p>	 <p>Azul de lactofenol 40X</p> <p>No identificado</p>


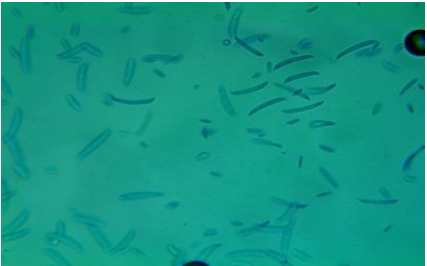
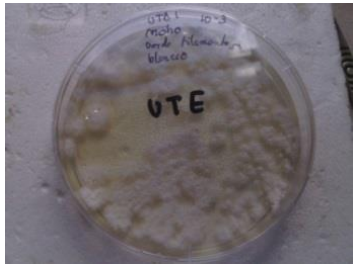
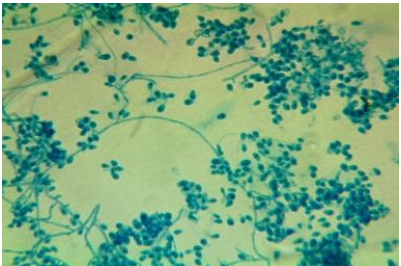

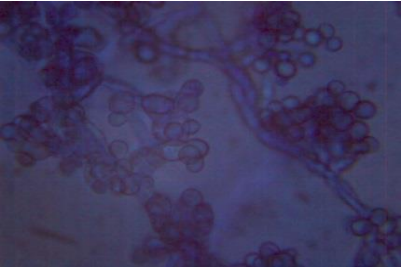
 <p><b>Codificación:</b> SJG</p> <p>Colonia en medio de cultivo PDA a los 4 días coloración verde en el interior y blanquecina en los bordes</p>	 <p><b>Género:</b> Penicillium</p> <p>Azul de lactofenol (40x)</p> <p>Hifas septadas, Conidióforos rectos, fiálides en forma de frasco sobre las que se ubican las conidias esféricas dispuestas en cadena.</p>
<p><b>Suelo:</b> San Luis</p>	<p><b>Temperatura de incubación:</b> 28°C</p>
 <p><b>Codificación:</b> SLA</p> <p>Colonia en medio de cultivo PDA a los 3 días, crecimiento abundante de textura algodonosa, coloración crema con puntuaciones negras.</p>	 <p><b>Género:</b> Mucor</p> <p>Azul de lactofenol 10X</p> <p>Esporangioforo ramificado con incrustaciones, esporangio globoso con esporangiosporas esféricas.</p>
 <p><b>Codificación:</b> SLB</p>	 <p><b>Género:</b> Penicillium o paecilomyces</p>

<p>Colonia en medio PDA a los 3 días, textura aterciopelada, coloración marrón.</p>	<p>Azul de lactofenol 40X Conidióforos cortos con conidias largas dispuestas en cadena.</p>
<p><b>Codificación: SLC</b> Colonia en medio de cultivo PDA a los 3 días, textura aterciopelada de coloración crema.</p> 	 <p>Género: <i>Epicoccum</i> Azul de lactofenol 40X Conidias globosas multinucleadas</p>
<p><b>Codificación: SLD</b> Colonia en medio de cultivo PDA, textura aterciopelada, coloración marrón.</p> 	 <p>Género: <i>Cladophialophora</i> Azul de lactofenol (10X) Hifas septadas de las cuales salen directamente los conidios, los conidios están unidos formando cadenas.</p>
<p><b>Codificación: SLE</b> Colonia en medio PDA a los 3 días, textura</p> 	 <p>Género: <i>Acremonium</i> Azul de lactofenol 10X Conidióforos largos y delgados, conidias de</p>

aterciopelada, coloración crema.	forma elípticas.
 <p><b>Codificación:</b> SLF          Colonia en medio PDA a los 3 días, textura aterciopelada, coloración oscura.</p>	 <p><b>Género:</b> Alternaria          Azul de lactofenol 40X          Hifa con estructuras similares a Alternaria conidios con septos de coloración marrón.</p>
 <p><b>Codificación:</b> SLG          Colonia en medio PDA a los 3 días, textura algodonosa, coloración crema.</p>	 <p>Azul de lactofenol 40X          No identificado presnetta conidias multinucleadas, de formas diferentes globosas, elipsoides.</p>
 <p><b>Codificación:</b> SLH          Colonia en medio PDA a los 3 días, textura afelpada, coloración marrón.</p>	 <p>Azul de lactofenol 40X          Hifas sin estructuras características</p>



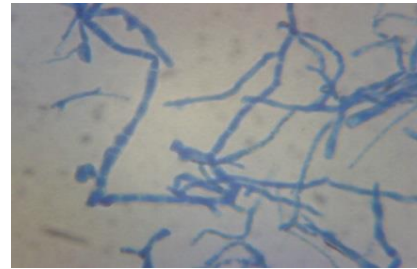
 <p><b>Codificación:</b> SLI</p> <p>Colonia en medio de cultivo PDA a los 3 días, textura aterciopelada, coloración ver oliva con borde blanquecinos.</p>	 <p><b>Género:</b> Aspergillus</p> <p>Azul de lactofenol (40X)</p> <p>Hifas tabicadas con Conidióforo Recto, fiálides que nacen de la métula, conidios redondas.</p>
<p><b>SUELO:</b> Estacion Experimental Querochaca</p>	<p><b>Temperatura de incubación:</b> 28°C</p>
 <p><b>Codificación:</b> UTA</p> <p>Colonia en PDA a los 3 dias, coloracion marron textura algodonosa.</p>	 <p>Azul de lactofenol 40X</p> <p>Sin identificar</p>
 <p><b>Codificación:</b> UTC</p> <p>Colonia en media de cultivo PDA cuyo Micelio es de coloración verde a los 3 días, textura filamentosa, borde entero.</p>	 <p><b>Género:</b> Aspergillus</p> <p>Azul de lactofenol (40X)</p> <p>Hifas tabicadas con Conidióforo Recto, fiálides que nacen de la métula, conidios</p>

	redondas.
 <p><b>Codificación:</b> UTD Colonia en PDA a los 3 días, micelio de color beige, textura aterciopelada</p>	 <p><b>Genero:</b> Fusarium Azul de lactofenol (40X) Macroconidios con 3 a 5 septos, fusiformes, ligeramente curvos.</p>
 <p><b>Codificación:</b> UTE Colonia en PDA a los 3 días coloración blanquecina textura afelpada.</p>	 <p><b>Género:</b> sporothrix Azul de lactofenol 40X</p>
 <p><b>Codificación:</b> UTF Colina en medio de cultivo PDA a los 3 días, coloración marrón en el centro con bordes blanquecinos, textura algodonosa.</p>	 <p><b>Género:</b> Botrytis Azul de lactofenol (40X) Hifa septada, conidiophoro con conidias ovales dispuestas en racimo</p>



**Codificación:** UTG

Colonia en medio de cultivo PDA, textura afelpada, micelio aplanado con coloración blanquecina, bordes rojizos



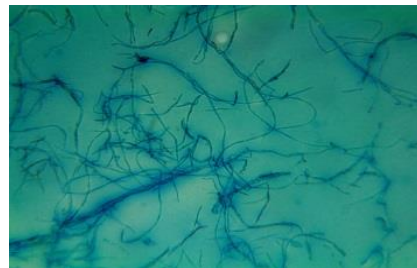
Azul de lactofenol 40x

Hifas sin estructuras características



**Codificación:** UTH

Colonia en agar PDA coloración blanquecina a los 3 días, con el pasar del tiempo va adquiriendo una coloración rojiza, cambia la coloración del medio.



Azul de lactofenol 40X

Hifas sin estructuras características,

**Anexo 3.** Incidencia y severidad de *Meloidogyne incognita*

<b>Grado</b>	<b>Agallas No.</b>	<b>Nematodos/100 g de suelo</b>	<b>Huevos y larvas J2/g de raíz</b>	<b>Calificación</b>
0	0	0	0	Libre
1	1 a 10	1 a 40	1 a 300	Baja
2	11 a 30	41 a 120	301 a 1000	Moderada
3	31 a 75	121 a 150	1001 a 3000	Alta
4	>75	>150	>3000	Muy alta

**Fuente:** RIVERA (1994)

**Anexo 4.** Agroquímicos de uso común en la parroquia san Luis

<b>GRUPO QUIMICO</b>	<b>INGREDIENTE ACTIVO</b>	<b>NOMBRE COMERCIAL</b>
	<b>Benfuracarb</b>	NAKAR 20% CE
		BENFUROL
	<b>Carbaryl</b>	SEVIN 80%
	<b>Carbofuran</b>	FURADAN 10 G
		FURADAN 5 G
		FURADAN 4 F
	<b>Carbosulfan</b>	ELTRA
		LANNATE 90
		AGRONNATE
		METHOMEX 90 PS
		THOMYL 90
		KUIK 900
	<b>Oxamyl</b>	VYDATE BLUE
		LARVIN 375
		KRYSOL 375
		CARBIN
		RADICAL
PONTIAC		
<b>GRUPO QUIMICO</b>	<b>INGREDIENTE ACTIVO</b>	<b>NOMBRE COMERCIAL</b>
<b>1B. ORGANOFOSFORADOS</b>	<b>Acephate</b>	ACEFATO 75% SP
		TROFEO
		ORTHENE
		ACEFATO 75% SP
		GLADIADOR 75 PS
		INVICTO
		HORTISEC
	<b>Chlorpyrifos</b>	RAFAGA
		CLORPIRIFOS 480 EC
		LORSBAN 4E
		LORSBAN 75 WG
		VEXTER
		LATIGO
		DISPARO
		CIPERFOS
		PUÑETE
		BALA 55
		POINTER
		BATAZO

	PYRINEX 48 EC
	SHARP
	BOLIDO
<b>Diazinon</b>	FLECHA
	PILOTO
	DIAZONEX
	DIAZOL
	CONFIABLE
<b>Dichlorvos/DDVP</b>	DICLORVEX
<b>Dimethoate</b>	DIMEPAC 400
	DIMETOATO 40 CE
	PERFEKTHION
	DIMETOATO
	DREXEL DIMETOATO 40 EC
	DIABOLO
	PREVIENE 40
<b>Fenamiphos</b>	NEMACUR 15G
<b>Malathion</b>	MALATHION 25% PM
	MALATHION
	MALATHION 25% WP
	MALATHION 250 WP
	MALATHION 50 WP
<b>Methamidophos</b>	CRYSOMARON 600
	METAFOS 600 CS
	MATADOR
	PINDOFOS
<b>Pirimiphos-methyl</b>	PLANETA DM
	PIRIMIDIPHOS METYL
	ATLETIC 50 EC
	PLANETA 50 EC
	BUFFAGO
	COURAGE
	CURACRON
<b>Terbufos</b>	COUNTER FC
	PILARFOX
	FORATER FC 15G
<b>Trichlorfon</b>	CEKUFON 80% PS

Fuente: LINDAO, V (2016)

**Anexo 5.** Análisis no paramétrico mediante prueba de Kruskal Wallis

<b>Cepa</b>	<b>Medias</b>	<b>D.E.</b>	<b>Medianas</b>	<b>H</b>	<b>p</b>
<b>GUA</b>	0,00	0,00	0,00	91,84	<0,001 **
<b>GUB</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>GUC</b>	46,00	4,58	47,00		
<b>GUD</b>	0,33	0,58	0,00		
<b>GUE</b>	40,67	12,01	40,00		
<b>GUF</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>GUG</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>GUH</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>GUI</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>GUJ</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>GUK</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>GUL</b>	40,00	6,56	39,00		
<b>PAA</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>PAB</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>PAC</b>	0,33	0,58	0,00		
<b>PAD</b>	18,33	6,81	16,00		
<b>PAE</b>	2,33	1,53	2,00		
<b>PAF</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>PAG</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>SJA</b>	28,33	7,51	28,00		
<b>SJB</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>SJC</b>	18,33	6,81	16,00		
<b>SJD</b>	0,67	0,58	1,00		
<b>SJE</b>	2,33	1,53	2,00		
<b>SJF</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>SJG</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>SLA</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>SLB</b>	20,33	9,61	22,00		
<b>SLC</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>SLD</b>	0,33	0,58	0,00		
<b>SLE</b>	27,67	1,53	28,00		
<b>SLF</b>	2,33	3,21	1,00		
<b>SLG</b>	0,67	1,15	0,00		
<b>SLH</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>SLI</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>SLJ</b>	38,00	5,29	36,00		
<b>UTA</b>	0,33	0,58	0,00		
<b>UTB</b>	4,67	6,43	2,00		
<b>UTC</b>	2,00	3,46	0,00		
<b>UTD</b>	39,00	3,00	39,00		
<b>UTE</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>UTF</b>	0,67	1,15	0,00		
<b>UTG</b>	6,00	6,00	6,00		
<b>UTH</b>	7,33	4,51	7,00		

**Anexo 6.** Comparación de apares para selección de las mejores cepas

<b>Cepa</b>	<b>Mediana</b>	<b>Rango</b>
<b>GUC</b>	128,83	a
<b>GUE</b>	124,33	a
<b>GUL</b>	123,83	a
<b>UTD</b>	123,83	a
<b>SLJ</b>	122,50	a
<b>SJA</b>	114,50	ab
<b>SLE</b>	113,67	ab
<b>SLB</b>	109,50	ab
<b>PAD</b>	108,83	ab
<b>SJC</b>	99,50	abc
<b>UTH</b>	99,33	abc
<b>PAE</b>	89,33	abc
<b>SJE</b>	89,33	abc
<b>UTG</b>	80,83	abc
<b>UTB</b>	78,17	abc
<b>SLF</b>	73,50	abc
<b>SJD</b>	68,50	abc
<b>UTC</b>	59,00	c
<b>UTF</b>	56,33	c
<b>SLG</b>	56,33	c
<b>UTA</b>	54,00	c
<b>SLD</b>	54,00	c
<b>PAC</b>	54,00	c
<b>GUD</b>	54,00	c
<b>PAG</b>	39,50	c
<b>PAF</b>	39,50	c
<b>UTE</b>	39,50	c
<b>PAB</b>	39,50	c
<b>PAA</b>	39,50	c
<b>SJB</b>	39,50	c
<b>SLI</b>	39,50	c
<b>SLC</b>	39,50	c
<b>SLA</b>	39,50	c
<b>SJG</b>	39,50	c
<b>SJF</b>	39,50	c
<b>GUF</b>	39,50	c
<b>GUG</b>	39,50	c
<b>GUH</b>	39,50	c
<b>GUA</b>	39,50	c
<b>GUB</b>	39,50	c
<b>SLH</b>	39,50	c
<b>GUK</b>	39,50	c
<b>GUI</b>	39,50	c
<b>GUJ</b>	39,50	c



**Anexo 7.** Datos porcentuales de nematodos con y sin actividad

<b>24 horas</b>							
<b>Codificación de la cepa</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>% Nematodos con actividad</b>			<b>% Nematodos inactivos</b>		
		<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
TESTIGO	T0	90	97,5	87,5	10	2,5	12,5
GUC	T1	37,5	25	37,5	62,5	75	62,5
GUE	T2	52,5	45	62,5	47,5	55	37,5
GULL	T3	85	75	80	15	25	20
PAD	T4	70	77,5	65	30	22,5	35
SJA	T5	55	72,5	62,5	45	27,5	37,5
SLB	T6	25	40	42,5	75	60	57,5
SLE	T7	40	35	52,5	60	65	47,5
SL J	T8	62,5	55	67,5	37,5	45	32,5
UTD	T9	77,5	62,5	70	22,5	37,5	30
<b>48 horas</b>							
TESTIGO	T0	87,5	95	87,5	12,5	5	12,5
GUC	T1	32,5	25	30	67,5	75	70
GUE	T2	47,5	45	52,5	52,5	55	47,5
GULL	T3	75	60	75	25	40	25
PAD	T4	45	52,5	47,5	55	47,5	52,5
SJA	T5	55	72,5	65	45	27,5	35
SLB	T6	22,5	32,5	32,5	77,5	67,5	67,5
SLE	T7	35	35	47,5	65	65	52,5
SL J	T8	42,5	45	47,5	57,5	55	52,5
UTD	T9	60	52,5	47,5	40	47,5	52,5
<b>72 horas</b>							
TESTIGO	T0	87,5	90	82,5	12,5	10	17,5
GUC	T1	27,5	22,5	30	72,5	77,5	70
GUE	T2	42,5	35	37,5	57,5	65	62,5
GULL	T3	52,5	57,5	65	47,5	42,5	35
PAD	T4	45	50	42,5	55	50	57,5
SJA	T5	50	70	60	50	30	40
SLB	T6	22,5	32,5	27,5	77,5	67,5	72,5

SLE	T7	30	27,5	40	70	72,5	60
SL J	T8	30	35	42,5	70	65	57,5
UTD	T9	55	42,5	47,5	45	57,5	52,5
<b>96 horas</b>							
TESTIGO	T0	85	87,5	82,5	15	12,5	17,5
GUC	T1	22,5	10	12,5	77,5	90	87,5
GUE	T2	30	35	35	70	65	65
GULL	T3	52,5	47,5	55	47,5	52,5	45
PAD	T4	37,5	47,5	35	62,5	52,5	65
SJA	T5	37,5	62,5	55	62,5	37,5	45
SLB	T6	22,5	32,5	25	77,5	67,5	75
SLE	T7	20	12,5	25	80	87,5	75
SL J	T8	22,5	32,5	40	77,5	67,5	60
UTD	T9	45	42,5	45	55	57,5	55

**Anexo 8.** Datos transformados (Bliss) para análisis de varianza ADEVA

<b>Tiempo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Repetición</b>	<b>% Nematodos inactivos</b>
24 H	T0	R1	18,43
24 H	T0	R2	0,00
24 H	T0	R3	20,70
24 H	T1	R1	52,24
24 H	T1	R2	60,00
24 H	T1	R3	52,24
24 H	T2	R1	43,57
24 H	T2	R2	47,87
24 H	T2	R3	37,76
24 H	T3	R1	22,79
24 H	T3	R2	30,00
24 H	T3	R3	26,57
24 H	T4	R1	34,76
24 H	T4	R2	30,00
24 H	T4	R3	37,76
24 H	T5	R1	42,13
24 H	T5	R2	31,63
24 H	T5	R3	37,76
24 H	T6	R1	60,00
24 H	T6	R2	50,77
24 H	T6	R3	49,31
24 H	T7	R1	50,77
24 H	T7	R2	53,73
24 H	T7	R3	43,57
24 H	T8	R1	37,76
24 H	T8	R2	42,13
24 H	T8	R3	34,76
24 H	T9	R1	28,32
24 H	T9	R2	37,76
24 H	T9	R3	33,21
48 H	T0	R1	20,70
48 H	T0	R2	0,00
48 H	T0	R3	20,70
48 H	T1	R1	55,24
48 H	T1	R2	60,00
48 H	T1	R3	56,79
48 H	T2	R1	46,43
48 H	T2	R2	47,87
48 H	T2	R3	43,57
48 H	T3	R1	30,00
48 H	T3	R2	39,23
48 H	T3	R3	30,00

---

48 H	T4	R1	55,24
48 H	T4	R2	49,31
48 H	T4	R3	52,24
48 H	T5	R1	42,13
48 H	T5	R2	31,63
48 H	T5	R3	36,27
48 H	T6	R1	61,68
48 H	T6	R2	55,24
48 H	T6	R3	55,24
48 H	T7	R1	53,73
48 H	T7	R2	53,73
48 H	T7	R3	46,43
48 H	T8	R1	49,31
48 H	T8	R2	47,87
48 H	T8	R3	46,43
48 H	T9	R1	39,23
48 H	T9	R2	43,57
48 H	T9	R3	46,43
72 H	T0	R1	20,70
72 H	T0	R2	20,70
72 H	T0	R3	24,73
72 H	T1	R1	58,37
72 H	T1	R2	61,68
72 H	T1	R3	56,79
72 H	T2	R1	49,31
72 H	T2	R2	53,73
72 H	T2	R3	52,24
72 H	T3	R1	43,57
72 H	T3	R2	40,69
72 H	T3	R3	36,27
72 H	T4	R1	58,37
72 H	T4	R2	50,77
72 H	T4	R3	56,79
72 H	T5	R1	45,00
72 H	T5	R2	33,21
72 H	T5	R3	39,23
72 H	T6	R1	61,68
72 H	T6	R2	55,24
72 H	T6	R3	58,37
72 H	T7	R1	56,79
72 H	T7	R2	58,37
72 H	T7	R3	50,77
72 H	T8	R1	56,79
72 H	T8	R2	53,73
72 H	T8	R3	49,31
72 H	T9	R1	42,13

---

---

<b>72 H</b>	T9	R2	49,31
<b>72 H</b>	T9	R3	46,43
<b>96 H</b>	T0	R1	22,79
<b>96 H</b>	T0	R2	20,70
<b>96 H</b>	T0	R3	24,73
<b>96 H</b>	T1	R1	61,68
<b>96 H</b>	T1	R2	71,57
<b>96 H</b>	T1	R3	69,30
<b>96 H</b>	T2	R1	56,79
<b>96 H</b>	T2	R2	53,73
<b>96 H</b>	T2	R3	53,73
<b>96 H</b>	T3	R1	43,57
<b>96 H</b>	T3	R2	46,43
<b>96 H</b>	T3	R3	42,13
<b>96 H</b>	T4	R1	58,37
<b>96 H</b>	T4	R2	52,24
<b>96 H</b>	T4	R3	60,00
<b>96 H</b>	T5	R1	52,24
<b>96 H</b>	T5	R2	37,76
<b>96 H</b>	T5	R3	42,13
<b>96 H</b>	T6	R1	61,68
<b>96 H</b>	T6	R2	55,24
<b>96 H</b>	T6	R3	60,00
<b>96 H</b>	T7	R1	63,43
<b>96 H</b>	T7	R2	69,30
<b>96 H</b>	T7	R3	60,00
<b>96 H</b>	T8	R1	61,68
<b>96 H</b>	T8	R2	55,24
<b>96 H</b>	T8	R3	50,77
<b>96 H</b>	T9	R1	47,87
<b>96 H</b>	T9	R2	49,31
<b>96 H</b>	T9	R3	47,87

---