



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DEL HONGO
***Pleurotus ostreatus* IN VITRO EN DIFERENTES**
CONCENTRACIONES SOBRE DOS ESPECIES DE NEMÁTODOS”

TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACION

Presentado para optar al grado académico de:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: LIZETH VIVIANA ALVEAR DÍAZ
TUTOR: Dr. IVÁN RAMOS

Riobamba-Ecuador
2018

©2018, **Lizeth Viviana Alvear Díaz** Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que la investigación: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* IN VITRO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE DOS ESPECIES DE NEMÁTODOS”, de responsabilidad de la señorita Lizeth Viviana Alvear Díaz, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizado su presentación.

| NOMBRE | FIRMA | FECHA |
|---|--------------|--------------|
| Dr. Iván Ramos DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN | _____ | _____ |
| Dr. Fausto Yaulema MIEMBRO DEL TRIBUNAL | _____ | _____ |

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Lizeth Viviana Alvear Díaz, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en 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, 01 de febrero de 2018

.....
Lizeth Viviana Alvear Díaz
C.I. 0603956988

DEDICATORIA

A mis padres, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, tanto académica, como de la vida, por todos los esfuerzos que han realizado para brindarme todo lo necesario y sobre todo apoyo incondicional en todo momento.

Lizeth Alvear Díaz

AGRADECIMIENTO

A mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento también un soporte incondicional en la parte moral y económica para poder llegar a cumplir mis metas. A mis hermanos, por ser mi compañía y el apoyo que siempre me brindan día a día.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y en particular a la Escuela de Ciencias Químicas, Carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental por haberme permitido mi formación profesional.

Agradezco al Dr. Iván Ramos por su guía, asesoramiento, paciencia y oportunos conocimientos durante el desarrollo del trabajo de titulación al igual al Dr. Fausto Yaulema por sus valiosos aportes durante el progreso del presente trabajo.

A la Dra. Norma Erazo, tan buena disposición, paciencia, por todo el soporte académico y por sus valiosos aportes durante el desarrollo de la investigación.

A mis amigos por confiar y creer en mí y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré.

A mi familia por su apoyo y comprensión.

Lizeth Alvear Díaz

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| RESUMEN | xvi |
| ABSTRACT..... | xvii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| JUSTIFICACIÓN | 3 |
| OBJETIVOS | 4 |
| Objetivo General | 4 |
| Objetivos Específicos..... | 4 |
| CAPITULO I | |
| 1 MARCO TEÓRICO | 5 |
| 1.1 Antecedentes de la investigación..... | 5 |
| 1.2 Control biológico..... | 6 |
| 1.2.1 Clases de control biológico..... | 6 |
| 1.2.1.1 Clásico..... | 6 |
| 1.2.1.2 Inundación..... | 6 |
| 1.2.1.3 Conservación..... | 7 |
| 1.2.2 Ventajas del control biológico | 7 |
| 1.2.3 Hongos nematófagos | 7 |
| 1.2.3.1 Hongos atrapadores de nematodos | 7 |
| 1.2.3.2 Hongos endoparásitos o endozóicos | 8 |
| 1.2.3.3 Hongos parásitos de huevos | 8 |
| 1.2.3.4 Hongos productores de toxinas..... | 8 |
| 1.3 Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> | 8 |
| 1.3.1 Taxonomía..... | 9 |
| 1.3.2 Características | 9 |
| 1.3.3 Ciclo de reproducción | 10 |
| 1.3.4 Acción nematocida del <i>Pleurotus</i> | 10 |
| 1.4 Nematodos | 11 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| 1.4.1 | Taxonomía de los nematodos | 11 |
| 1.4.2 | Clasificación..... | 13 |
| 1.5 | Nematodo – <i>Passalurus sp.</i> | 13 |
| 1.5.1 | Información taxonómica de <i>Passalurus sp.</i> | 13 |
| 1.5.2 | Morfología | 13 |
| 1.5.3 | Ciclo evolutivo | 14 |
| 1.5.4 | Signos clínicos y lesiones | 14 |
| 1.5.5 | Conejo - <i>Oryctolagus cuniculus</i> | 14 |
| 1.5.5.1 | Clasificación taxonómica | 15 |
| 1.5.5.2 | Reproducción | 15 |
| 1.6 | Nematodo - <i>Meloidogyne sp.</i> | 15 |
| 1.6.1 | Taxonomía..... | 16 |
| 1.6.2 | Ciclo de vida | 16 |
| 1.6.3 | Síntomas ocasionados por los nematodos..... | 17 |
| 1.6.4 | Lechuga - <i>Lactuca sativa L.</i> | 17 |
| 1.6.4.1 | Taxonomía..... | 18 |
| 1.6.4.2 | Variedad | 18 |
| CAPITULO II | | |
| 2 | METODOLOGÍA | 19 |
| 2.1 | Hipótesis y especificación de variables | 19 |
| 2.1.1 | Identificación de variables..... | 19 |
| 2.1.1.1 | Variable dependiente | 19 |
| 2.1.1.2 | Variables Independientes..... | 19 |
| 2.1.2 | Hipótesis..... | 19 |
| 2.1.2.1 | Hipótesis nula..... | 19 |
| 2.1.2.2 | Hipótesis alternativa | 19 |
| 2.2 | Tipo y diseño de la investigación | 20 |
| 2.2.1 | Por el tipo de investigación | 20 |
| 2.2.2 | Por el diseño de la investigación | 20 |

| | | |
|---------------------|--|----|
| 2.2.3 | Lugar de investigación | 20 |
| 2.2.4 | Unidad de análisis | 21 |
| 2.2.5 | Población de estudio..... | 21 |
| 2.3 | Etapas de la investigación | 22 |
| 2.3.1 | Materiales, equipos y reactivos..... | 22 |
| 2.3.2 | Obtención del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> | 23 |
| 2.3.3 | Preparación de muestra..... | 23 |
| 2.3.4 | Obtención del extracto etanólico | 23 |
| 2.3.5 | Obtención del extracto acuoso..... | 24 |
| 2.3.6 | Muestreo de estiércol de conejo | 24 |
| 2.3.7 | Muestreo del suelo de la rizosfera de las lechugas..... | 24 |
| 2.3.8 | Extracción de nematodos..... | 25 |
| 2.3.8.1 | Extracción del nematodo <i>Passalurus sp</i> | 25 |
| 2.3.8.2 | Extracción del nematodo <i>Meloidogyne sp.</i> | 26 |
| 2.3.9 | Selección de la población de nemátodos | 26 |
| 2.3.10 | Determinación de la mortalidad de los nematodos | 28 |
| CAPITULO III | | |
| 3 | RESULTADOS | 29 |
| 3.1 | Análisis de resultados | 29 |
| 3.1.1 | Mortalidad de dos especies de nematodos por efecto de los extractos etanólico y acuoso del <i>Pleurotus ostreatus</i> en cuatro concentraciones, en cuatro tiempos. | 29 |
| 3.1.2 | Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante el extracto etanólico y acuoso..... | 30 |
| 3.1.3 | Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos a través de las concentraciones de los extractos del <i>P. ostreatus</i> | 31 |
| 3.1.4 | Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante el tiempo de exposición..... | 32 |
| 3.1.5 | Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante la interacción entre extractos y concentraciones del <i>Pleurotus ostreatus</i> | 33 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.1.6 | Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante la interacción entre extractos y tiempo | 34 |
| 3.1.7 | Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante la interacción entre concentración de los extractos y el tiempo de exposición | 36 |
| | CONCLUSIONES | 38 |
| | RECOMENDACIONES | 38 |
| | BIBLIOGRAFÍA | |
| | ANEXOS | |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1-1 Taxonomía <i>Pleurotus ostreatus</i> | 9 |
| Tabla 2-1 Taxonomía de <i>Passalurus sp.</i> | 13 |
| Tabla 3-1 Taxonomía del Conejo | 15 |
| Tabla 4-1 Taxonomía de <i>Meloidogyne sp.</i> | 16 |
| Tabla 5-1 Taxonomía de la lechuga | 18 |
| Tabla 1-2 Selección de la cantidad de nematodos para las dos especies, las cuatro concentraciones y los cuatro tiempos | 27 |
| Tabla 1-3 Análisis de la Varianza para mortalidad de dos especies de nematodos de los extractos etanólico y acuoso del <i>Pleurotus ostreatus</i> en cuatro concentraciones y cuatro tiempos..... | 29 |
| Tabla 2-3 Análisis de la Varianza para mortalidad de dos especies de nematodos de los extractos etanólico y acuoso del <i>Pleurotus ostreatus</i> en cuatro concentraciones y cuatro tiempos..... | 30 |
| Tabla 3-3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos de las cuatro concentraciones de los extractos del <i>P. ostreatus</i> | 31 |
| Tabla 4-3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante los cuatro tiempos de exposición | 32 |
| Tabla 5-3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos a causas de las cuatro concentraciones del extracto etanólico y acuoso <i>Pleurotus ostreatus</i> | 33 |
| Tabla 6-3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos para la interacción extractos etanólico, acuoso y los cuatro tiempos de exposición. | 35 |
| Tabla 7-3 Porcentaje de mortalidad para las dos especies de nematodos a causa de los cuatro tiempos de exposición y los extractos etanólico y acuoso | 36 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1-1 Partes del hongo | 9 |
| Figura 2-1 Ciclo de reproducción del <i>Pleurotus ostreatus</i> | 10 |
| Figura 3-1 Nematodo | 11 |
| Figura 4-1 Taxonomía de los nematodos | 12 |
| Figura 5-1 Ciclo de vida de <i>Meloidogyne sp.</i> | 16 |
| Figura 1-2 Ubicación de los laboratorios donde se ejecutó la investigación..... | 21 |
| Figura 2-2 Equipo Soxhlet | 24 |
| Figura 3-2 Embudo de Baermann | 25 |

ÍNDICE DE GRAFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1-3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante el extracto acuoso y etanólico del <i>P. ostreatus</i> | 30 |
| Gráfico 2-3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos con respecto a las cuatro concentraciones de los extracto del <i>P. Ostreatus</i> | 31 |
| Gráfico 3-3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante los cuatro tiempos de exposición | 32 |
| Gráfico 4-3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos para la interacción entre el extracto etanólico y acuoso y las cuatro concentraciones del extracto..... | 34 |
| Gráfico 5-3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos para la interacción extractos etanólico, acuoso y los cuatro tiempos de exposición. | 35 |
| Gráfico 6-3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos para la interacción entre las cuatro concentraciones y los cuatro tiempos de exposición. | 37 |

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A Tratamiento para el extracto etanólico

ANEXO B Tratamiento para el extracto acuoso

ANEXO C Códigos de los tratamientos en cajas Petri

ANEXO D Preparación de la muestra del *Pleurotus ostreatus*

ANEXO E Obtención del extracto etanólico

ANEXO F Obtención del extracto acuoso

ANEXO G Muestreo y extracción de nematodos *Passalurus sp.*

ANEXO H Muestreo y extracción de los nematodos *Meloidogyne sp*

ANEXO I Selección y mortalidad de nematodos (*Passalurus sp. Meloidogyne sp.*)

ANEXO J Mortalidad de los nematodos (*Passalurus sp. Meloidogyne sp.*)

ANEXO K Cantidad de *Passalurus sp* muertos

ANEXO L Cantidad de individuos *Meloidogyne sp* muertos

ANEXO M Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos

ANEXO N Espectro infrarrojo del extracto etanólico del *Pleurotus ostreatus*

ANEXO O Espectro infrarrojo del extracto acuoso del *Pleurotus ostreatus*

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|---|
| <i>P. Ostreatus</i> | <i>Pleurotus ostreatus</i> |
| MAGAP | Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca |
| min | minutos |
| h | hora |
| % | porcentaje |
| Ej. | ejemplo |
| μ | micro |
| μl | micro litros |
| cm | centímetros |
| ml | mililitros |
| mm | milímetros |
| g | gramos |
| Ho | hipótesis nula |
| Hi | hipótesis alternativa |
| ppm | partes por millón |

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue evaluar la actividad nematocida del extracto del *Pleurotus ostreatus* en diferentes concentraciones sobre los nematodos *Passalurus sp* extraídos del estiércol de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y *Meloidogyne sp* del suelo de la rizosfera de las lechugas (*Lactuca sativa L*). Se realizó la extracción del *Pleurotus ostreatus* en el equipo Soxhlet, después se ejecutó la extracción de los nematodos (*Passalurus sp -Meloidogyne sp*), mediante el método del embudo de Baermann, luego por maceración del micelio del *Pleurotus ostreatus* se obtuvo el extracto acuoso, posteriormente se seleccionó la población de 30 nematodos de cada especie, para cada concentración (12, 25,50, y 75) del extracto etanólico y acuoso, durante 10, 20,30 y 60 minutos de exposición. Por medio de la prueba Tukey con nivel de significancia (0,05) para las fuentes de variación altamente significativas para el porcentaje de mortalidad de los nematodos, fueron: el extracto etanólico que obtuvo el 99,10% y el acuoso el 1.40% de muerte en las dos especies de nematodos y en el tiempo de exposición alcanzó el 51,60% de mortalidad durante los 60 min, en las interacciones entre la concentración de 75µl de los extractos del *P. ostreatus* en 60 min se logró el 54% de mortalidad y con el extracto etanólico en 60 min de exposición se alcanzó el 99.42% de mortalidad de las dos especies de nematodos. Se concluyó que el *Pleurotus ostreatus* tuvo actividad nematocida mayor del extracto etanólico con el 99,10 % de mortalidad sobre nematodos *Passalurus sp* y *Meloidogyne sp* y en menor porcentaje con el extracto acuoso. Se recomienda Realizar nuevas investigaciones con otras especies de nematodos y diferentes concentraciones del extracto del hongo *Pleurotus ostreatus*.

PALABRAS CLAVES

< BIOTECNOLOGÍA >, < MICROBIOLOGÍA >, < NEMATÓFAGOS >, < NEMATODOS >, < OSTRA (*Pleurotus ostreatus*) >, < CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*) >, < LECHUGA (*Lactuca sativa L*) >,

ABSTRACT

The purpose of this research was evaluate the nematicidal activity of the *Pleurotus ostreatus* extract in different concentrations on the *Passalurus sp* extracted from rabbit manure (*Oryctolagus cuniculus*) and *Meloidogyne sp* from the soil of the rhizosphere of lettuce (*Lactuca sativa L*). The extraction of the *Pleurotus ostreatus* was done in the Soxhlet team, after the extraction of the nematodes (*Passalurus sp- Meloidogyne sp*) was developed, through Baermann funnel method and by maceration of the *Pleurotus ostreatus* mycelium the aqueous extract was obtained, then the population of 30 nematodes of each species was selected for each concentration (12, 25, 50 and 75 µl) of the ethanolic and aqueous extract, during 10, 20, 30 and 60 minutes of exposure. Through Tukey test with significance level (0.05) for highly significant sources of variation for the mortality percentage of the nematodes, were: the ethanolic extract that obtained 99.10% and the aqueous extract 1.40. % death in the two species of nematodes and at the time of exposure reached 51.60% about mortality during the 60 min, in the interactions between the concentration of 75µl of the extracts of *P. ostreatus* in 60 min, the 54% of mortality and with the ethanolic extract in 60 min of exposure 99.42% of mortality of the two species of nematodes was reached. It was concluded that *Pleurotus ostreatus* had greater nematicidal activity than ethanolic extract with 99.10% mortality on *Passalurus sp* and *Meloidogyne sp* nematodes and in a lower percentage with aqueous extract. It is recommended to develop new investigations with other species of nematodes and with different concentrations of the extract of the fungus *Pleurotus ostreatus*.

Keywords: BIOTECHNIA, MICROBIOLOGY, NEMATOPHAGOS, NEMATODOS, OSTRA (*Pleurotus ostreatus*), RABBIT (*Oryctolagus cuniculus*), LETTUCE (*Lactuca sativa L*).

INTRODUCCIÓN

La agricultura en el Ecuador es muy significativa para su economía. El control de las plagas que afectan a los cultivos es uno de los problemas más comunes en este sector debido a las pérdidas económicas que acarrear. La fumigación excesiva con productos químicos (Ej: plaguicidas, insecticidas, nematicidas, etc.) para el control de estas plagas generan problemas de contaminación ambiental de suelo, agua y aire. Para reducir el efecto de esta contaminación, se intentan desarrollar alternativas que disminuyan el uso de estos compuestos tóxicos, pues muchos de ellos pueden acumularse y causar el deterioro de suelo y fuentes de agua natural, e incluso disminuir la actividad biodegradadora de algunos microorganismos.

Los cultivos con mayores pérdidas económicas son las hortalizas, leguminosas y frutales, por lo general los productores no detectan el problema antes de la siembra y cuando lo identifican en su afán de salvar parte de la producción se ven obligados a utilizar nematicidas, productos peligrosos y de alto costo. (Triviño Carmen, 2003)

En uno de los cultivos que se encuentran nematodos es el de la lechuga (*Lactuca sativa l*) este se expande en Ecuador, donde según el III Censo Nacional Agropecuario, se siembran anualmente 1.644 hectáreas en monocultivo y en asociación, alcanzando una producción de 9.770 Tm/año; con rendimiento promedio de 7.5 Tm/ha. Informes del MAGAP reportan que 7.632 hectáreas son cultivadas y cosechadas, este cultivo es de ciclo corto, que son todos los cultivos cuyo ciclo vegetativo comprende de 50 - 60 días para las variedades tempranas y de 70-80 días para las tardías. (Pineda Danny, 2011)

El nematodo más conocido como agallador de raíces es el *Meloidogyne sp*, que en el Ecuador se encuentra presente en todas las regiones, tienen índices de reproducción sobre los 1000 huevos según (Triviño Carmen, 2003), este originando enfermedades importantes, provocando nódulos en las raíces de tamaño y formas variables, lo que provoca amarillamiento, manchas, pudrición, marchitez y menor crecimiento, retraso en la aparición de brotaciones y falta de desarrollo de las raíces.

La crianza de animales como bovinos, ovinos y especies menores como conejos, cuyes es una práctica común en las familias de las comunidades rurales del Ecuador, por lo que se presenta una alternativa alimenticia y económica de gran importancia, pero sin embargo son atacados y parasitados por los nematodos y pueden causar distintas enfermedades incluso al ser humano.

Además, se tiene la práctica de usar las excretas de animales como abono, donde ahí se encuentra los nematodos, lo cual se contamina el suelo y por ende los cultivos.

Un estudio realizado en el 2006 señala que la producción de conejos en el Ecuador es de aproximadamente 800,000 conejos anuales, de los cuales el 98%, se destina al consumo de carne y el 2% restante se convierte en mascotas o en animales experimentales para los laboratorios. Su crianza se efectúa en las cuatro regiones del país, pero el 50% del total nacional se localiza en Tungurahua, seguido en importancia de Pichincha, Chimborazo, Imbabura y Cotopaxi. (Fiallos, 2009 citado en Tipantasig Liliana, 2014)

Los nematodos especialmente en los conejos causan una disminución en el rendimiento reproductivo en hembras, diarrea y estreñimiento y hasta puede llegar a la anorexia, también disminución a la respuesta de inmunidad de la vacunación, además una predisposición a desarrollar otras enfermedades como consecuencia de la disminución de las defensas inmunológicas.

La preocupación sobre los nematicidas químicos ya que son tóxicos para la salud humana, el medio ambiente hace que busquemos otras alternativas biológicas, siendo una estrategia el control biológico ya que es una estrategia clave para el manejo de plagas y su fundamento es el uso de organismos benéficos para suprimir la densidad de población o impacto de un organismo plaga.

JUSTIFICACIÓN

El abuso de los nematocidas químicos utilizados para el control de plagas ha llegado a causar graves daños al medio ambiente y problemas de salud al hombre, tanto al que consume los alimentos tratados como al que los aplica a sus cultivos.

Entre los principales problemas que causan el uso excesivo de estos nematocidas podemos mencionar la bioacumulación y la resistencia de las plagas, lo cual genera, un aumento en los gastos por parte del agricultor debido a la necesidad de utilizar mayor cantidad de producto químico. Por lo que es necesario estrategias que se base en el uso de principios ecológicos para aprovechar al máximo los beneficios de la biodiversidad. Por esta razón, en la actualidad el control biológico se considera una pieza fundamental e indispensable ya que los beneficiados son muchos. (Pérez L, 2006)

El control biológico es el uso de organismos benéficos contra aquellos que causan daño lo cual y es de interés múltiple ya que ofrece varias ventajas como la relación coste/beneficio es muy favorable, evita plagas secundarias, no generan resistencia en las plagas, aplicación fácil y segura, contribuyen a la recuperación de las propiedades biológicas de los suelos, respetuosa con el medio ambiente y forman parte del ecosistema. (Nicholls, 2008)

Con esta investigación se pretendió fomentar la gran importancia de la sustitución de nematocidas químicos por nematocidas biológicos, utilizando hongos, bacterias que ente caso se trabajó con extractos del hongo *Pleurotus ostreatus* el cual tiene actividad nematocida y así continuar con los esfuerzos para evitar la contaminación ambiental, además, contribuir en la reducción en costos para el agricultor.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la actividad nematocida del extracto del hongo *Pleurotus ostreatus* in vitro en diferentes concentraciones sobre los nematodos *Passalurus sp* y *Meloidogyne sp*.

Objetivos Específicos

- Determinar la actividad nematocida del extracto etanólico y acuoso del *Pleurotus ostreatus* sobre los nematodos *Passalurus sp.* y *Meloidogyne sp.*
- Identificar el tiempo de exposición que causo mayor porcentaje de mortalidad sobre los nematodos *Passalurus sp.* y *Meloidogyne sp.*
- Especificar el mayor porcentaje de mortalidad que ocasiono la concentración de los extractos del *Pleurotus ostreatus* sobre los nematodos *Passalurus sp.* y *Meloidogyne sp.*

CAPITULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes de la investigación

El exceso de compuestos químicos es perjudicial para ser el humano y el ambiente lo que permitió buscar alternativas como el control biológico, siendo una de las opciones más importantes en la actualidad ya que la sustitución de nematicidas químicos por nematicidas biológicos utiliza hongos y bacterias que pueden estar en el medio o de lo contrario, estas pueden reproducirse en laboratorios. (Piedra, 2008)

Según el estudio realizado por Ricardo Piedra Naranjo (2008) titulado: El manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias, se debe a un trabajo que incentiva a cualquier tipo de investigaciones que se realizan sobre la actividad nematicida de los hongos nematófagos y bacterias, como controladores biológicos de nematodos fitoparásitos, por su reproducción fue fácil de obtener en los laboratorios.

Según la investigación de Sierra Janeth, 2014 titulado: Evaluación de la acción nematicida in vitro de especies de *Pleurotus sp.*, sobre nematodos *Meloidogyne sp* y *Radopholus sp* asociados a los cultivos de tomate y plátano, concluye que el tratamiento de *Pleurotus ostreatus* a las 72 horas en la dosis de 75 gramos, fue la que presentó un mayor porcentaje de individuos muertos con el 46.8% de mortalidad.

La investigación de Barron y Thorn 1987, titulado: “Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*”, muestra que el tiempo necesario para iniciar la infección depende de la distancia en que las hifas debían crecer para llegar al huésped, por lo cual de los 25 nematodos transferidos sólo fue recuperado 1 y de este modo concluye que el *Pleurotus ostreatus* tiene una excelente actividad nematicida, es decir que tiene el 96% de mortalidad.

Otras investigaciones como de Kwok, Plattner.R, Weisleder.D, y Wicklow (1992), con el tema de: “A nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526”, concluyen que la toxina del *Pleurotus ostreatus* NRRL3526 inmoviliza hasta el 95% de los nematodos (*Panagrellus redivivus*) dentro de 1 hora a 300 ppm de concentración.

1.2 Control biológico

El control biológico es el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, por lo cual tienen como fin reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o animal que causa daños al ser humano. (Serrano & Galindo, 2017)

Dentro del control biológico se distinguen tres grupos de organismos beneficiosos. A continuación, se muestran los ejemplos más comunes de cada categoría.

- **Predadores.** Ej. Ácaros depredadores, chinches
- **Parásitos.** Ej. Avispas parásitas y moscas parásitas
- **Microorganismos.** Ej. Nematodos, hongos, bacterias y virus (Sánchez, 2017)

1.2.1 Clases de control biológico

1.2.1.1 Clásico

Consiste en la introducción de un enemigo natural a cierto ambiente, desempeñando un papel importante de que el mismo se establezca y regule la plaga a la cual queremos controlar. Este método generalmente se utiliza en aquellos casos donde la plaga ha colonizado una nueva zona y por lo tanto sus enemigos naturales no se encuentran en la misma. No en todas las áreas puede llevarse a cabo este tipo de control, ya que no siempre la especie que actúa de enemigo natural llega a establecerse. En general se utiliza en ambientes estables como bosques, áreas naturales, cultivos frutales o forestales; donde la vegetación no se modifica constantemente. (Casafe, 2017a)

1.2.1.2 Inundación

Tiene como principal objetivo aumentar exponencialmente la cantidad de enemigos naturales, este puede llevarse a cabo de dos formas diferentes, la liberación por inundación que consiste en la liberación de un importante número de individuos donde se encuentre la plaga problema. Este método se asemeja al uso de insecticidas ya que permite un control rápido y eficaz. Este es utilizado en cultivos cortos o anuales como por ejemplo en cultivos bajo invernadero. Por otro lado, la técnica de inoculación consiste en la liberación periódica de un número más reducido de individuos, esta técnica se utiliza cuando la plaga problema aún no ha llegado a los umbrales críticos. De lo contrario se recomienda utilizar el control biológico por inundación o recurrir a algún insecticida. (Casafe, 2017b)

1.2.1.3 *Conservación*

Como su nombre lo indica tiene el objetivo de conservar y proteger la población de enemigos naturales ya presentes identificando cuáles son los factores que limitan esta población, por lo que implica un profundo conocimiento de la biología de la especie. Alguna de las medidas que pueden tomarse como ejemplo es la introducción de especies florales productoras de néctar y polen (en el caso que la especie que actúa de enemigo natural se alimente de ellos). (Casafe, 2017c)

1.2.2 *Ventajas del control biológico*

- La incorporación del control biológico es un medio de lucha integrada respetando el medio ambiente, debido a que no se emplean químicos y por lo que dan más seguridad evitando que estos productos sean tóxicos para la salud humana.
- El método de control biológico impide las poblaciones de parásitos en las plantaciones agrícolas y por consiguiente la pérdida de altos niveles de producción
- El uso de productos biológicos ya viene ajustados al tipo de parásito y llegan a matar una amplia gama de insectos y no producen daño a los insectos benígnos. (Manual control biologico,2005)

El control biológico con hongos es un área de investigación apasionante y de rápido desarrollo. Los diversos estudios de la relación entre hongos y nematodos han permitido hacer diferentes clasificaciones de los agentes de control.

1.2.3 *Hongos nematófagos*

Según (Barrón G.L, 2005 citado en Piedra, 2008) los hongos nematófagos son microorganismos que tienen la capacidad de atacar, matar y digerir nematodos (adultos, juveniles y huevos). Aparte de su habilidad nematófaga muchos de estos hongos pueden también vivir saprofiticamente en la materia orgánica muerta o atacando a otro tipo de hongos. Estos se dividen en cuatro grupos: hongos atrapadores de nematodos, hongos endoparásitos, hongos parásitos de huevos y hongos productores de toxinas.

1.2.3.1 *Hongos atrapadores de nematodos*

Estos hongos forman diversos tipos de órganos de captura a partir de la especialización de sus hifas, penetrando la cutícula del nematodo por la trampa y así formando la hinchazón de infección dentro del nematodo, a partir del cual las hifas tróficas crecen dentro del cuerpo y digieren sus contenidos. (Campos et al., 2009 citado en Mendoza Pedro, 2009a)

1.2.3.2 *Hongos endoparásitos o endozóicos*

Los hongos endoparásitos utilizan sus esporas para infectar nematodos. Estas setas son a menudo parásitos obligados de nematodos y fuera del cuerpo infectado del nematodo aparecen sólo como estructuras de propagación. Las esporas de estos hongos pueden ser zoosporas móviles que se enquistan sobre el nematodo adhiriéndose a él y penetrando la cutícula. (Barron, 1977 citado en Mendoza Pedro, 2009b).

1.2.3.3 *Hongos parásitos de huevos*

Estos hongos infectan estadios no móviles (huevos) de nematodo, produciendo infecciones en los extremos de las hifas que se adhieren a la cubierta del huevo, por lo que esta es penetrada por el mismo hongo y su contenido es digerido. (Barron, 1977 citado en Mendoza Pedro, 2009b).

1.2.3.4 *Hongos productores de toxinas*

El hongo más común de este grupo es el descomponedor de madera *Pleurotus ostreatus* y otros *Pleurotus sp.* Las hifas de estos hongos contienen una gota de toxina tras ponerse en contacto con la misma, por lo que el nematodo es rápidamente inmovilizado y las hifas del hongo crecen a través de la boca del nematodo que como en el caso de los anteriores hongos nematófagos es digerido. (Mendoza Pedro, 2009c; López Luis, 2001)

1.3 **Hongo *Pleurotus ostreatus***

Es un hongo que se alimenta de la materia orgánica, degradando las sustancias con enzimas que liberan al medio húmedo que les rodea. El agua es indispensable en la constitución de los hongos en proporción elevada, micelio 85% y esporas 45%. Su nombre deriva del griego “*pleuro*” significa formado lateralmente en referencia a la posición del pie respecto al sombrero y “*ostreatus*” en latín quiere decir en forma de ostra y en este caso se refiere a la apariencia y al color del cuerpo fructífero también conocido con nombre común de hongo ostra también como gírgola, champiñón ostra, seta, orellana y orejas blancas. (Ravera, C et al; 2008)

1.3.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica de *Pleurotus ostreatus* se evidencia en la Tabla 1.1:

Tabla 1.1 Taxonomía *Pleurotus ostreatus*

| | |
|---------|--------------------|
| Reino | Fungi |
| Filo | Basidiomycota |
| Clase | Homobasidiomycetes |
| Orden | Agaricales |
| Familia | Pleurotaceae |
| Género | <i>Pleurotus</i> |
| Especie | <i>P.ostreatus</i> |

Fuente: (Cruz, D et al; 2010)

1.3.2 Características

Las principales partes del hongo se esquematiza en la Figura 1.1 son:

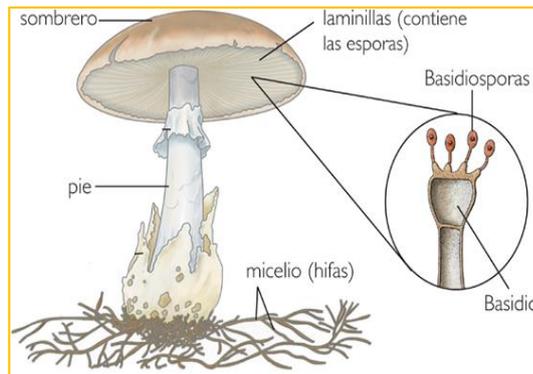


Figura 1.1 Partes del hongo

Fuente: Michel et al., 2010 citado en Aguinaga, 2012

El sombrero o píleo es la parte comestible del hongo tiene la forma redondeada, su superficie es lisa, abombada y convexa cuando es joven y se aplanan en la madurez, su diámetro oscila entre 5 y 15 cm, según la edad del hongo y el color es variable, con tonos blancos, grises con el tiempo obtiene un espectro más amarillento. (López C, 2011)

Las laminillas se encuentran en la parte inferior del sombrero colocadas radialmente, que van desde el pie o tallo que lo sostiene hasta el borde del sombrero, están espaciadas unas de otras, su color son blancas o cremas, en ellas se producen las esporas destinadas a la reproducción de la especie. Las esporas son pequeñas, alargadas, casi cilíndricas, en gran número forman masas de polvo de color blanco, con cierto tono lila grisáceo. (Aguinaga, Paulina; 2012a)

El pie o estipe es la parte de la seta que sostiene al sombrero suele ser corto, grueso, una longitud de 0,5 a 3,0 cm y de 0,5 a 2,0 cm de espesor, algo inclinado, ligeramente duro, blanco, con el principio de las láminas en la parte de arriba y con vellosidades en la base. (Figura 1.1) (Cruz, D et al; 2010) (Aguinaga, Paulina; 2012b)

1.3.3 Ciclo de reproducción

Los hongos se reproducen por medio de esporas (Figura 2.1), en ellos existen dos fases de desarrollo que son la vegetativa o micelial y la fase de fructificación o crecimiento reproductivo: La fase micelial empieza con la liberación de esporas, después germinan originando un micelio primario llamado monocarion; este se fusiona con otro micelio monocarion, dando origen a un micelio secundario o dicarion después se da la fase de fructificación ocurre cuando el micelio binucleado se desarrolla y se forman uno o varios cuerpos fructíferos en los cuales en su himenio (zona donde se localizadas las esporas de origen sexual,) terminara la reproducción sexual con la formación de basidiosporas en los basidios. (López. C et. Al; 2011)

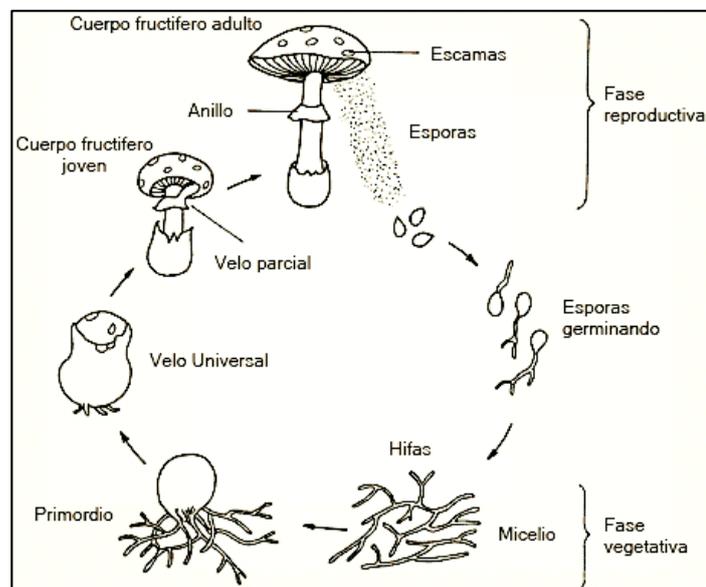


Figura 2.1 Ciclo de reproducción del *Pleurotus ostreatus*
Fuente: (Alder Maite, 2014)

1.3.4 Acción nematocida del *Pleurotus*

Estos hongos producen hifas vegetativas, las cuales generan gotas de toxinas, al ponerse en contacto con éstas, los nematodos quedan inactivos rápidamente, las hifas del hongo invaden al nematodo por los orificios del cuerpo. Sin embargo, reportan que la capacidad nematocida de estas

toxinas y la expresión de los síntomas varían dependiendo de la especie de hongo y del tiempo de exposición. (Sierra Janeth, 2014)

El uso de hongos comestibles es una tradición medicinal, debido a sus efectos curativos a través de metabolitos secundarios con propiedades terapéuticas. A la fecha se han aislado 23 metabolitos con actividad nematocida de *P. ostreatus*, además de otro tipo de componentes con actividad nematocida como: alcaloides, quinonas, péptidos, terpenoides, ácidos grasos, poli fenoles, entre otros. (Sánchez José, 2017)

1.4 Nematodos

El termino nematodo proviene de los vocablos griegos (*Nema* = hilo y *Oidos* = con aspecto de). Son gusanos que se encuentran extensamente distribuidos en una variedad de hábitats. Algunos tienen vida libre; otros son parásitos de plantas y de animales vertebrados o invertebrados, con unas 25000 especies descritas. (Armendáriz, Ignacio; et al, 2015)

Los nematodos son organismos pequeños de 300 a 100 μm , siendo algunos mayores a 4 μm de longitud por 15 a 35 μm , de ancho. Su diámetro pequeño hace que no sean observables a simple vista, pero se pueden ver con facilidad en el microscopio. Los nematodos tienen, en general, forma de anguila y en corte transversal se ven redondos, presentan cuerpos lisos no segmentados y carecen de patas. (Figura 3.1) (Agrios, p. 661)

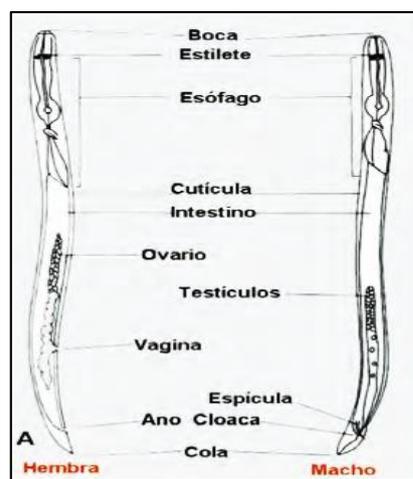


Figura 3.1 Nematodo
Fuente Diez Rojo et al, 2010

1.4.1 Taxonomía de los nematodos

La taxonomía de los nematodos tiene por objetivo ubicar y catalogar individuos mediante las clases de la sistemática zoológica (Figura 4.1). Este autor agrupa los nematodos bajo el Phylum

Nemata y las clases Secernentea y adenophorea que tiene como plasmidia (órganos glandulares sensoriales) y aphasmidia (carecen de glándulas sensoriales). (Crescencio, 2015)

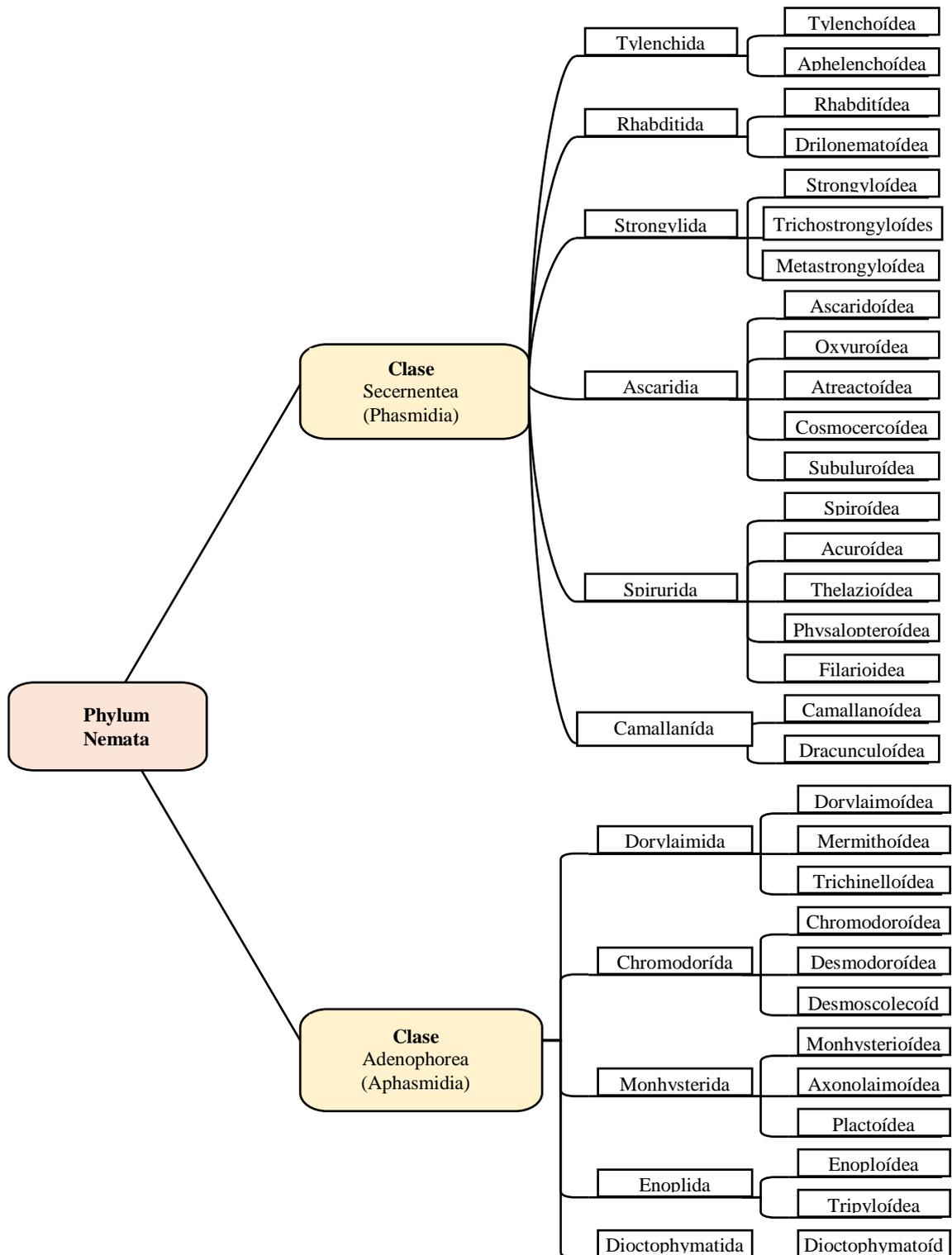


Figura 4.1 Taxonomía de los nematodos

Fuente: (Crescencio, 2015)

1.4.2 Clasificación

De acuerdo con sus fuentes alimenticias

- **Saprofitos:** Se alimentan de materia orgánica en descomposición.
- **Predadores o zooparásitos:** Devoran animales incluyendo otros nematodos.
- **Fitoparásitos:** Se nutren de plantas. En términos de hábitat, los nematodos fitopatógenos son *Ectoparásitos* estas especies se alimentan desde afuera introduciendo solamente el estilete, *Semiendoparásitos* comen introduciendo la mitad de su cuerpo, los *endoparásitos* es una especie que se nutren metiendo todo su cuerpo, *endoparásitos sedentarios* come de una parte de la planta, principalmente la raíz y los *endoparásitos migratorios* se nutren de la raíz, pero pueden desplazarse a las hojas. (Salas Julio, 2017; Agrios, p. 666)

1.5 Nematodo – *Passalurus sp.*

Este parásito es muy frecuente en conejos de campo y domésticos, incluidos de granja, ya que las larvas infectantes no salen de los huevos puestos por las hembras del parásito y, por lo tanto, están muy protegidas hasta que son ingeridas por un nuevo hospedador. (Gutiérrez, Juan; 2015)

1.5.1 Información taxonómica de *Passalurus sp.*

La información taxonómica del nematodo en la Tabla 3.1.

Tabla 2.1 Taxonomía de *Passalurus sp.*

| | |
|----------------|-------------------|
| Reino | Animalia |
| Phylum | Nematoda |
| Clase | Secernentea |
| Orden | Ascaridida |
| Familia | Oxyuridae |
| Género | <i>Passalurus</i> |

Fuente: (EOL, 2013)

1.5.2 Morfología

Son de color semitransparentes, el macho adulto *Passalurus sp.* posee una sola espícula y tiene de 3,8 mm a 5 mm de largo, mientras que las hembras adultas miden de 5,3 mm a 11 mm de largo

y aproximadamente 40 estriaciones cuticulares de la cola. Los huevos son alargados, de 93 μ a 105 μ de largo y 43 μ de ancho, y se aplastan en un lado.

1.5.3 *Ciclo evolutivo*

Los huevos son puestos en el recto en estado de blástula (desarrollo embrionario) en donde evolucionan al estado infectante en 18-24 horas, salen con las heces y permanecen viables durante algún tiempo. La infestación se realiza por medio de la ingestión de los huevos que contienen la L2 por lo cual estos eclosionan al llegar al intestino. La muda L3, L4, así como la madurez sexual del parásito se realiza en las criptas mucosa del ciego y de otras partes del intestino grueso. (Quiroz Héctor, 2005)

1.5.4 *Signos clínicos y lesiones*

En el caso de infecciones moderadas o masivas se manifiestan con anorexia, enflaquecimiento, pelaje erizado y sin brillo, diarrea y condición dermatológica caracterizada por el picor en la zona anal (prurito anal). (Chauca, 1997 citado en Quiroz, 2005)

La penetración de las larvas en la mucosa del ciego y del colon provoca una irritación, incluso una inflamación, que favorece la presencia de infecciones relacionadas por otros parásitos. La sintomatología de la oxiuridosis es poco específica y depende del número de parásitos presentes. (Gutiérrez Juan ,2015)

Otros autores han informado de los cambios inflamatorios en el ciego, distrofia vacuolar en el hígado y riñones de los conejos infectados, acompañado por la estimulación inmune general. (Quiroz Héctor, 2005)

1.5.5 *Conejo - *Oryctolagus cuniculus**

El conejo es un mamífero que se alimenta exclusivamente de hierbas y granos, su cuerpo está cubierto por unos pelos espesos y suaves, propensos al pánico, por eso su trato y transporte debe ser cuidadoso. Cuando se encuentran nerviosos pueden arañar con los miembros posteriores, excepcionalmente y llegan a morder. (Fuentes Flor et al, 2010)

1.5.5.1 Clasificación taxonómica

En la Tablas 2.1 se indica la clasificación taxonómica del conejo:

Tabla 3.1 Taxonomía del Conejo

| | |
|----------------|--------------------|
| Reino | Animalia |
| Filo | Chordata |
| Clase | Mamalia, mamíferos |
| Orden | Lagomorpha |
| Familia | Leporidae |
| Género | Oryctolagus |
| Especie | <i>O.cuniculus</i> |

Fuente: (Fuentes Flor et al, 2010; p.7; Márquez Manuel; 2014)

1.5.5.2 Reproducción

La edad más adecuada para iniciar la reproducción en los conejos varía según la raza, el sexo, estación y las características individuales. La vida reproductiva del conejo se extiende desde los 6 meses de edad a los 3 y 4 años. El tiempo de gestación de la hembra dura entre 31 a 32 días y la lactancia 56 días totalizando 87 días. Paren entre cuatro a diez ejemplares, las crías nacen ciegas y sin pelo no obstante a las cuatro semanas ya pueden ingerir alimento sólido. (Manuel Márquez; 2014; Fuentes Flor et al, 2010a; p. 12)

Por lo tanto, cada hembra esta teóricamente en condiciones de parir y criar cuatro camadas al año con un periodo de descanso de 17 días. Es recomendable utilizar al macho como reproductor luego de cumplidos los ocho meses de edad, al principio una vez por semana y luego hasta dos veces por semana. (Fuentes Flor et al, 2010b; p. 12)

1.6 Nematodo - *Meloidogyne sp.*

Se conoce vulgarmente nematodos de agallas ya que forma nódulos en raíces y gusano redondo, debido a la forma de su cuerpo en un corte transversal. Se podría decir que es un endoparásito porque se alimentan metiendo todo su cuerpo y deposita sus huevos dentro de las raíces de las plantas o junto a estas. Una vez dentro de la raíz, comienza a inyectar sustancias tóxicas que provocan un crecimiento anormal de los tejidos de la planta y provoca la generación de agallas. (Carmona G.et al., 2014)

1.6.1 Taxonomía

En la Tabla 5.1 se identifica la taxonomía del nematodo *Meloidogyne sp.*

Tabla 4.1 Taxonomía de *Meloidogyne sp.*

| | |
|-------------------|--------------------|
| Reino | Animalia |
| Phylum | Nematoda |
| clase | Secernentea |
| Orden | Tylenchida |
| Subfamilia | Tylenchoidea |
| Familia | Meloidogynidae |
| Género | <i>Meloidogyne</i> |

Fuente: (Taylor, Sasser, 1983 citado Escobar, 2006)

1.6.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Meloidogyne*, como se observa en la Figura 6.1, está dado por una serie de cuatro estadios juveniles, separados por mudas (cambio de cutícula). El primer estadio se caracteriza por un huevo embrionario donde crece una pequeña larva. Esta fase termina con la primera muda. El segundo estadio denominado J2 es el infectivo dado a que el nematodo penetra la raíz y migrar a un sitio cercano del tejido vascular para destinarlo como un sitio permanente de alimento. El sedentarismo del nematodo se inicia con la alimentación y da inicio al tercer estadio. La adultez la alcanza en el cuarto estadio. Las hembras adultas son bulbosas y carecen de movilidad, la producción de huevos empieza pasadas las 3 a 6 semanas de la infección inicial dependiendo de las condiciones ambientales y características de las especies. (Williamson & Hussey, 1996 citado en Zárate, Santiago; 2008)

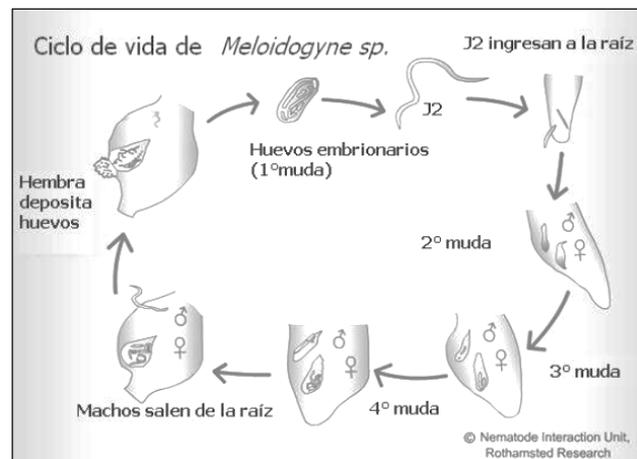


Figura 5.1 Ciclo de vida de *Meloidogyne sp.*

Fuente: (Zárate, Santiago; 2008)

1.6.3 Síntomas ocasionados por los nematodos

Los nematodos que infectan a las plantas producen síntomas tanto en las raíces como en los órganos aéreos de las plantas. Los síntomas de la raíz aparecen en forma de nudos, agallas o lesiones en ella, ramificación excesiva de la raíz, puntas dañadas de estas última y pudriciones de la raíz cuando las infecciones por nematodos van acompañadas por bacterias y hongos saprofitos o fitopatógenos. (Carmona G.et al., 2014)

Estos síntomas con frecuencia van acompañados por otras señales no característicos en los órganos aéreos de las plantas y que aparecen principalmente en forma de un menor crecimiento, deficiencia en nutrientes como el amarillamiento del follaje, el marchitamiento excesivo en tiempo cálido o seco, una menor producción de las plantas y una baja calidad de sus productos. (Agrios, 2002 citado en Carmona G.et al., 2014)

Algunas especies de nematodos invaden los órganos aéreos de las plantas más que las raíces, y en ello producen agallas, pudriciones y lesiones necróticas (muerte), retorcimientos o deformaciones de las hojas y tallos y un desarrollo anormal de los verticilos florales. Algunos nematodos atacan a los granos o gramíneas formando agallas llenas de ellos mismos en vez de semillas. (Agrios, p. 668)

1.6.4 Lechuga - *Lactuca sativa* L.

La lechuga (*Lactuca sativa* L.), se consume durante todas las épocas del año, por lo que siempre existe en el mercado gran demanda de este producto. La duración del cultivo suele ser de 50-60 días para las variedades tempranas y de 70-80 días para las tardías, como término medio, desde la plantación hasta la recolección. (Figura 5.1) (Japón José, p.2)

1.6.4.1 Taxonomía

En la Tabla 4.1 se indica la clasificación taxonómica de la lechuga

Tabla 5.1 Taxonomía de la lechuga

| | |
|--------------------------|------------------------|
| Reino | Espermatofita |
| División | Angiospermas |
| Subclase | Dicotiledónea |
| Familia | Compositae (Asteracea) |
| Género | <i>Lactuca</i> |
| Especie | <i>L.Sativa</i> |
| Variedad Botánica | <i>Capitata</i> |

Fuente: (Osorio & Lobo, 1983, citado en Jaramillo Jorge, 2016)

1.6.4.2 Variedad

Las variedades de lechuga se pueden clasificar en los siguientes grupos botánicos:

Romanas: *Lactuca sativa var. Longifolia*, no forman un verdadero cogollo, las hojas son oblongas, con bordes enteros y nervio central ancho, ejemplo: la romana y la baby.

Acogolladas: *Lactuca sativa var. Capitata*, estas lechugas forman un cogollo apretado de hojas, ejemplo: Batavia, Mantecosa o Trocadero, Iceberg.

De hojas sueltas: *Lactuca sativa var. Inybacea*, son lechugas que poseen las hojas sueltas y dispersas, ejemplo: Lollo Rossa, Red Salad Bowl, Cracarelle.

Lechuga espárrago: *Lactuca sativa var. Augustaza*, son aquellas que se aprovechan por sus tallos, teniendo las hojas puntiagudas y lanceoladas. (Casaca Ángel, 2005)

Lechugas de cabeza, arrepollada (*L. sativa var. capitata L.*)

En este grupo se encuentran las lechugas que se caracterizan por presentar cabeza cerrada y mayor resistencia al daño mecánico. En su interior las hojas forman un cogollo apretado o cabeza firme, las hojas exteriores son abiertas, gruesas, crujientes con bordes rizados y sirven de envoltura y protección al cogollo. (Flórez et al., 2012, citado en Jaramillo Jorge, 2016)

CAPITULO II

2 METODOLOGÍA

2.1 Hipótesis y especificación de variables

2.1.1 *Identificación de variables*

2.1.1.1 *Variable dependiente*

- Porcentaje de mortalidad

2.1.1.2 *Variables Independientes*

- Extractos
- Concentraciones
- Nematodos
- Tiempo de exposición

2.1.2 *Hipótesis*

2.1.2.1 *Hipótesis nula*

H0: Los extractos, concentraciones, el tiempo de exposición no causa mortalidad en las dos especies de nematodos (*Passalurus sp* y *Meloidogyne sp.*).

2.1.2.2 *Hipótesis alternativa*

H1: Al menos un extracto, una concentración y un determinado tiempo de exposición causan mortalidad en las dos especies de nematodos (*Passalurus sp* y *Meloidogyne sp.*).

2.2 Tipo y diseño de la investigación

2.2.1 Por el tipo de investigación

Este trabajo de titulación es investigación aplicada, ya que realizo la indagación teórica y se llevó a la práctica.

2.2.2 Por el diseño de la investigación

El diseño de la investigación es Experimental, debido a que se manipula los diferentes factores como concentración, los cuatro tiempos y los nematodos *Passalurus sp* y *Meloidogyne sp*, para evaluar actividad nematocida del *Pleurotus ostreatus*.

2.2.3 Lugar de investigación

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias y en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Figura 1.2), en el primero laboratorio se realizó la extracción del extracto etanólico del *Pleurotus ostreatus*, y en el de Ciencias Bilógicas de se ejecutó la extracción del extracto acuoso del hongo y la mortalidad de los nematodos *Passalurus sp* y *Meloidogyne sp*.



Figura 1.2 Ubicación de los laboratorios donde se ejecutó la investigación
Fuente: Google Earth

2.2.4 *Unidad de análisis*

El extracto etanólico y acuoso del *Pleurotus ostreatus*.

2.2.5 *2.2.5 Población de estudio*

Fueron 96 tratamientos para el extracto etanólico, para las diferentes variantes que hubo: cuatro concentraciones, cuatro tiempos, en dos especies de nematodos y las tres repeticiones, también 96 tratamientos para el extracto acuoso para las mismas variantes antes mencionadas. (Anexo A-B)

2.3 Etapas de la investigación

2.3.1 *Materiales, equipos y reactivos*

Materiales

- Mortero
- Papel filtro
- Dos mangueras
- Reverbero
- Soporte universal
- Pinzas
- Cartucho o dedal (muestra)
- Hilo y aguja
- Gasas
- Frasco vidrio
- Pala
- Guantes
- Marcador permanente
- Fundas ziploc
- Pala
- Marcador permanente
- Cuchillo
- Soporte
- Servilleta
- Ligas
- Criba de 25 μm
- Vaso de precipitación 20 ml
- Cajas Petri
- Micro Pipeta
- Pipeta Pauster
- Libreta
- Esfero
- Marcador
- Reloj
- Cámara fotográfica

Reactivo

- Etanol

Equipos

- Balanza analítica
- Estufa
- Equipo Soxhlet
- Rotavapor
- Embudo de Baermann
- Microscopio

2.3.2 Obtención del hongo *Pleurotus ostreatus*

El *Pleurotus ostreatus*, fue proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. (Anexo D.1)

2.3.3 Preparación de muestra

Los hongos fueron deshidratados en la estufa a 45 °C durante 24 horas después fue triturado y pesado 10g para cada una de las 8 extracciones, luego los 10g pesados fue colocada en el cartucho o llamado también dedal (Anexo D.3 y D.4).

2.3.4 Obtención del extracto etanólico

La extracción se realizó en el equipo Soxhlet (Figura 2.2), donde se utilizó 10 g de *Pleurotus ostreatus* y 200 ml de etanol para cada una de las ocho extracciones. Una vez que se ha dado por terminada la operación de extracción, el extracto que quedo en el balón fue llevado al equipo rotavapor a la temperatura de la extracción del solvente, el extracto concentrado que se obtuvo en las ocho extracciones fue de 7ml de extracto, luego fue colocado en una botella de vidrio ámbar y se etiqueto. (Núñez C, 2008). (ANEXO E)

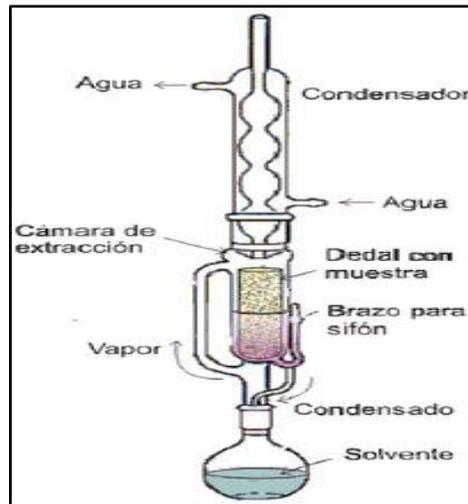


Figura 2.2 Equipo Soxhlet
Fuente: (Guarnizo.A; 2009)

2.3.5 Obtención del extracto acuoso

Se macero 6g de micelio del *Pleurotus ostreatus* con 10 ml de agua durante 15min y del cual se obtuvo 14 ml de extracto acuoso, luego se colocó en un frasco de ámbar y se lo etiquetó. (ANEXO F)

2.3.6 Muestreo de estiércol de conejo

El muestreo de estiércol de conejo se realizó en la Unidad Académica de especies menores de la Facultad de Ciencias Pecuarias, se recogió aleatoriamente las muestras de estiércol de conejo. Por lo que efectuó lo siguiente:

- ❖ Tomar con una pala el estiércol de conejo y colocar en bolsas ziploc de los diferentes puntos muestreados.
- ❖ Identificar las muestras
- ❖ Llevar al laboratorio
- ❖ De la muestra recogida sacar las ramas de alfalfa para dejar solo el estiércol para la extracción de los nematodos. (ANEXO G.1)

2.3.7 Muestreo del suelo de la rizosfera de las lechugas

Para realizar el muestreo del suelo de la rizosfera del cultivo de lechuga se estableció lo siguiente:

- ❖ Se identificó dónde se va a muestrear
- ❖ Para muestrear se utilizó una pala para sacar raíces con suelo adherido

- ❖ La muestra se deposita en una bolsa ziploc.
- ❖ Luego se identificó la muestra que plantación, fecha y otros datos (ANEXO H.1)

2.3.8 Extracción de nematodos

2.3.8.1 Extracción del nematodo *Passalurus sp*

Se ejecutó la extracción de nematodos mediante el embudo de Baermann (Figura 3.2) consta de un embudo de 12 cm de diámetro de vidrio en la parte inferior una manguera de hule suave que sostiene un tubo de vidrio, este método de extracción se basa en el movimiento de nematodos, ya que las heces son suspendidas en agua y estos nematodos se mueven hacia el fondo, donde pueden ser recolectadas mediante el tubo que se encuentra en la parte inferior del embudo y en la parte superior una malla para la muestras.

La muestra de estiércol de conejo se coloca en una servilleta para que no se derrame la muestra se coloca una liga de ahí va al embudo de Baermann, se esperó dos horas, luego el agua se vierte por una criba de 25 μm de diámetro donde los nematodos se quedan, luego es lavado con un poco de agua y recogido los nematodos en un vaso de precipitación de 10 a 20 ml. (ANEXO G.2 y G.3)

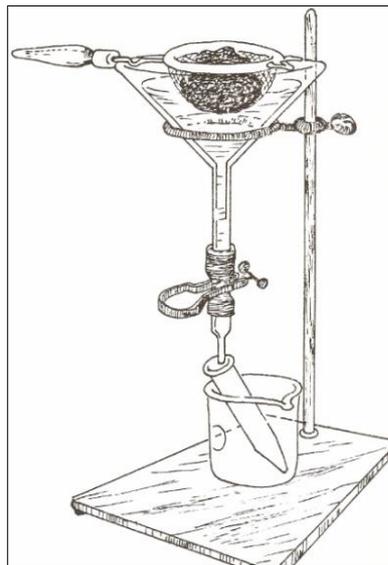


Figura 3.2 Embudo de Baermann
Fuente: (Morales Gustavo, 2016)

2.3.8.2 *Extracción del nematodo Meloidogyne sp.*

Mediante el embudo de Baermann (Figura 3.2) se extrajeron los nematodos el cual consta de un embudo de vidrio de 12 cm de diámetro con una malla en la parte superior para sostener la muestra y en la parte inferior una manguera de hule suave que sostiene un tubo de vidrio.

Luego la muestra de suelo de la rizosfera de las lechugas se ubicó en una servilleta y para que no se riegue se coloca una liga, después se puso la muestra de suelo en la malla del embudo de Baermann y se llenó de agua potable hasta la muestra (ANEXO H.2 – H.3). Pasado de 24 horas el agua se vierte por una criba de 25 μm de diámetro donde los nematodos se quedan, luego es lavado con un poco de agua y recogido en un vaso de precipitación de 20 ml los nematodos.

2.3.9 *Selección de la población de nemátodos*

Los nematodos extraídos del estiércol de conejo y de la rizosfera de las lechugas se seleccionó 30 nematodos como se muestra cómo se indica en la Tabla 1.2 para cada una de las cuatro concentraciones escogidas también para cada tiempo determinado y cada nematodo *Passalurus sp* y *Meloidogyne sp*, con la ayuda de una micro pipeta (Thermo LabSystems 4500 de 10-100 μl pipeta Finnpiquette) por el microscopio (AmScope). (ANEXO I)

Tabla 1.2 Selección de la cantidad de nematodos para las dos especies, las cuatro concentraciones y los cuatro tiempos

| | <i>Passalurus sp.</i> | | | <i>Meloidogyne sp.</i> | | |
|---------------------------|-----------------------|--------|------------|------------------------|--------|------------|
| | Concentración | Tiempo | #Nematodos | Concentración | Tiempo | #Nematodos |
| Extracto etanólico | 12 | 10min | 30 | 12 | 10min | 30 |
| | | 20min | 30 | | 20min | 30 |
| | | 30min | 30 | | 30min | 30 |
| | | 60min | 30 | | 60min | 30 |
| | 25 | 10min | 30 | 25 | 10min | 30 |
| | | 20min | 30 | | 20min | 30 |
| | | 30min | 30 | | 30min | 30 |
| | | 60min | 30 | | 60min | 30 |
| | 50 | 10min | 30 | 50 | 10min | 30 |
| | | 20min | 30 | | 20min | 30 |
| | | 30min | 30 | | 30min | 30 |
| | | 60min | 30 | | 60min | 30 |
| 75 | 10min | 30 | 75 | 10min | 30 | |
| | 20min | 30 | | 20min | 30 | |
| | 30min | 30 | | 30min | 30 | |
| | 60min | 30 | | 60min | 30 | |
| Extracto Acuoso | 12 | 10min | 30 | 12 | 10min | 30 |
| | | 20min | 30 | | 20min | 30 |
| | | 30min | 30 | | 30min | 30 |
| | | 60min | 30 | | 60min | 30 |
| | 25 | 10min | 30 | 25 | 10min | 30 |
| | | 20min | 30 | | 20min | 30 |
| | | 30min | 30 | | 30min | 30 |
| | | 60min | 30 | | 60min | 30 |
| | 50 | 10min | 30 | 50 | 10min | 30 |
| | | 20min | 30 | | 20min | 30 |
| | | 30min | 30 | | 30min | 30 |
| | | 60min | 30 | | 60min | 30 |
| 75 | 10min | 30 | 75 | 10min | 30 | |
| | 20min | 30 | | 20min | 30 | |
| | 30min | 30 | | 30min | 30 | |
| | 60min | 30 | | 60min | 30 | |

Realizado por: Lizeth Alvear, 2017

2.3.10 Determinación de la mortalidad de los nematodos

En una población de 30 nematodos para cada una de las cuatro concentraciones del extracto etanólico y acuoso, para los cuatro tiempos de exposición, los nematodos *Passalurus sp* y *Meloidogyne sp* que se planteó en la investigación.

En cada caja Petri de 30 nematodos se colocó 12, 25, 50 y 75 µl de extracto etanólico en un tiempo de exposición de 10, 20, 30 y 60 min y para cada una de las especies de nematodos. El mismo procedimiento se realizó para el extracto acuoso del *Pleurotus ostreatus*, posteriormente se observó por el microscopio los nematodos muertos (ANEXO J, K y L) y por último se obtuvo el porcentaje de mortalidad

Para analizar los datos obtenidos se sometieron al análisis de varianza (ANAVA) y prueba de comparación de medias de Tukey a un nivel de probabilidad del 5% mediante el empleo del programa InfoStat 2017.

CAPITULO III

3 RESULTADOS

3.1 Análisis de resultados

3.1.1 Mortalidad de dos especies de nematodos por efecto de los extractos etanólico y acuoso del *Pleurotus ostreatus* en cuatro concentraciones, en cuatro tiempos.

Para la prueba *in vitro*, se realizó el análisis de varianza para el porcentaje de mortalidad (efecto nematicida) de dos especies de nematodos (*Passalurus sp* y *Meloidogyne sp.*) por efecto de los extractos etanólico y acuoso provenientes de *Pleurotus ostreatus* sometidos a cuatro concentraciones que son 12, 25,50 y 75 %, en cuatro tiempos de exposición 10 min, 20 min, 30 min y 60 min, lo cual indicó diferencias altamente significativos para extractos, tiempo de exposición, extractos *tiempo y concentración*tiempo, en cambio para los significativos fueron concentración, extractos * concentración. (Tabla 1.3 y ANEXO M)

Tabla 1.3 Análisis de la Varianza para mortalidad de dos especies de nematodos de los extractos etanólico y acuoso del *Pleurotus ostreatus* en cuatro concentraciones y cuatro tiempos.

| Fuente de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | p-valor |
|-------------------------|-------------------|--------------------|------------------|-----------|------------|
| Extractos | 458251,11 | 1 | 458251,11 | 208015,31 | <0,0001 ** |
| Concentraciones | 45,14 | 3 | 15,05 | 6,83 | 0,0002 * |
| Nematodos | 4,09 | 1 | 4,09 | 1,85 | 0,1752 ns |
| Tiempo | 120,4 | 3 | 40,13 | 18,22 | <0,0001 ** |
| Extractos*concentración | 25,72 | 3 | 8,57 | 3,89 | 0,0102 * |
| Extractos*nematodos | 0,75 | 1 | 0,75 | 0,34 | 0,5601 ns |
| Extractos*tiempo | 69,56 | 3 | 23,19 | 10,53 | <0,0001 ** |
| Concentración*nematodos | 4,13 | 3 | 1,38 | 0,62 | 0,6000 ns |
| Concentración*tiempo | 86,03 | 9 | 9,56 | 4,34 | <0,0001 ** |
| Error | 341,46 | 155 | 2,20 | | |
| Total | 458963,2 | 191 | | | |
| CV 2,95 | | | | | |

**/ Denotan diferencias o efectos altamente significativos (< P 0.0001)

3.1.2 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante el extracto etanólico y acuoso

Se observa en la Tabla 2.3 que el extracto etanólico presenta el 99.10% de mortalidad estadísticamente siendo altamente significativo ($p > 0.001$) y ocupando el nivel A, al contrario, para el extracto acuoso murieron el 1,40% de los nematodos *Passalurus sp* y *Meloidogyne sp*, quedando en el grupo B. (Grafico 1. 3)

Tabla 2.3 Análisis de la Varianza para mortalidad de dos especies de nematodos de los extractos etanólico y acuoso del *Pleurotus ostreatus* en cuatro concentraciones y cuatro tiempos.

| Extractos | % de mortalidad | Grupo | |
|--------------------|-----------------|-------|---|
| Extracto Etanólico | 99,10 | A | |
| Extracto Acuoso | 1,40 | | B |

Con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

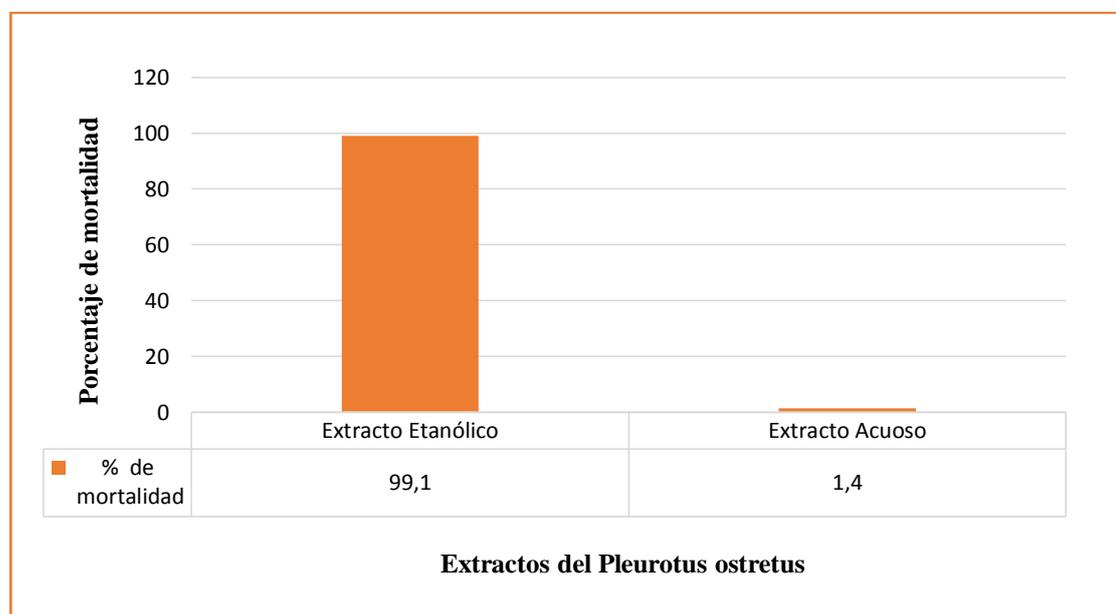


Gráfico 1.3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante el extracto acuoso y etanólico del *P. ostreatus*

Realizado por: Lizeth Alvear, 2017

Datos de la investigación de Heydari, R. Pourjam, E y Mohammadi, G. (2006), de los filtrados de cultivo del *P. ostreatus* mostraron mayor actividad nematicida hacia *Meloidogyne sp* en el estado J2, en una dilución mataron el 100% de nematodos en un período de 24h, en la cual hubo una similitud en porcentaje alto ya que se obtuvo 99.10% de mortalidad con el extracto etanólico pero el tiempo de exposición varían ya que de 60 min a 24h hay una gran diferencia, en cambio con

los datos de menor porcentaje de mortalidad en (Heydari, et al.,2006) fue en una dilución de 25 durante 4 horas de exposición mataron el 10,6 % de *Meloidogyne* sp.,comparando con el extracto acuoso obtuvo menor porcentaje de muerte que una fuente de variación pudo ser el menor tiempo de exposición.

3.1.3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos a través de las concentraciones de los extractos del *P. ostreatus*

El Grafico 2.3 y la Tabla 3.3 indica que con 75 µl de concentración de extracto acuoso y etanólico del *P. ostreatus* causa un mayor porcentaje de mortalidad dado que este se encuentra en el grupo A con el 50,96% de muerte de los nematodos *Passalurus* sp y *Meloidogyne* sp, para el 50 µl de extracto se obtuvo una mortalidad del 50.44% estando en el grupo A - B y para las concentraciones de 25 µl y 12 µl de los extractos resultaron en el grupo B.

Tabla 3.3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos de las cuatro concentraciones de los extractos del *P. ostreatus*

| Concentración | Porcentaje de mortalidad | Grupo | |
|---------------|--------------------------|-------|---|
| 75 µl | 50,96 | A | |
| 50 µl | 50,44 | A | B |
| 25 µl | 49,83 | | B |
| 12 µl | 49,77 | | B |

Con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

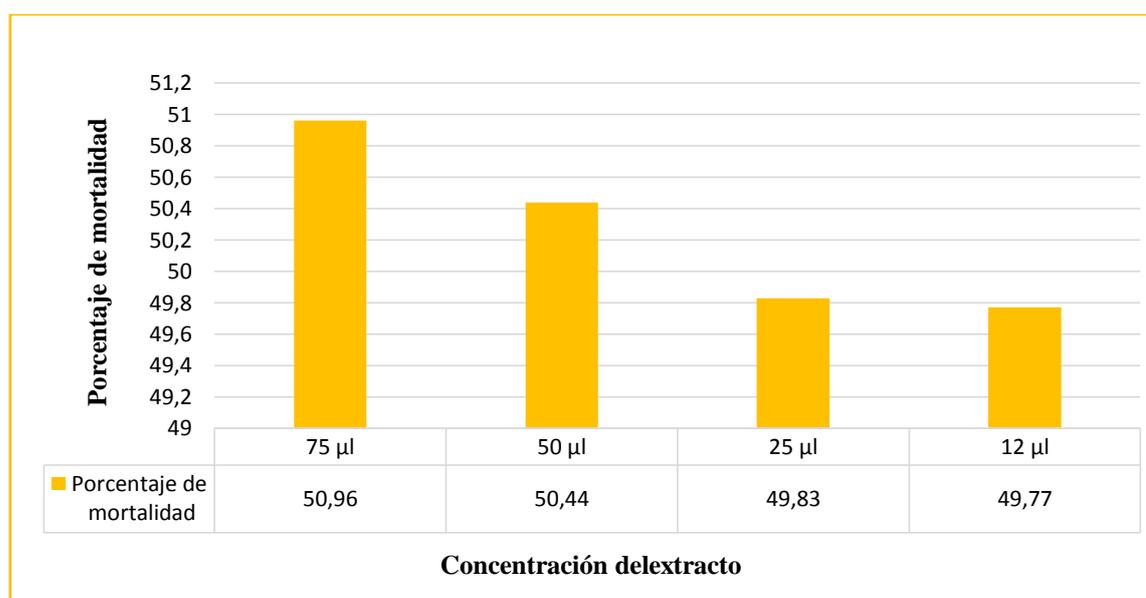


Gráfico 2 .3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos con respecto a las cuatro concentraciones de los extracto del *P. Ostreatus*

Realizado por: Lizeth Alvear, 2017

En la investigación de Barron y Thorn 1987, que fueron transferidos 25 nematodos y sólo 1 recuperado, de este modo se comparó con el extracto etanólico se obtuvo la mortalidad de los 30 nematodos escogidos sobre las cuatro concentraciones, en cambio para el extracto acuoso mayor mortalidad se obtuvo en 75µl con la muerte de 2 nematodos *Meloidogyne sp* y 3 *Passalurus sp*.

3.1.4 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante el tiempo de exposición

En cuanto al tiempo de exposición de los extractos etanólico y acuoso del *Pleurotus ostreatus* (Tabla 4.3), se identificó que el mejor resultado en la muerte de las dos especies de nematodos fue de 60 min con el 51.60% de mortalidad dando esto el nivel A, por lo tanto, para los 30,20 y 10 minutos que obtuvieron un porcentaje menor se encuentran en el grupo B. (Grafico 3.3)

Tabla 4.3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante los cuatro tiempos de exposición

| Tiempo | % de mortalidad | Grupo |
|--------|-----------------|-------|
| 60 min | 51,60 | A |
| 30 min | 49,98 | B |
| 20 min | 49,79 | B |
| 10 min | 49,63 | B |

Con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

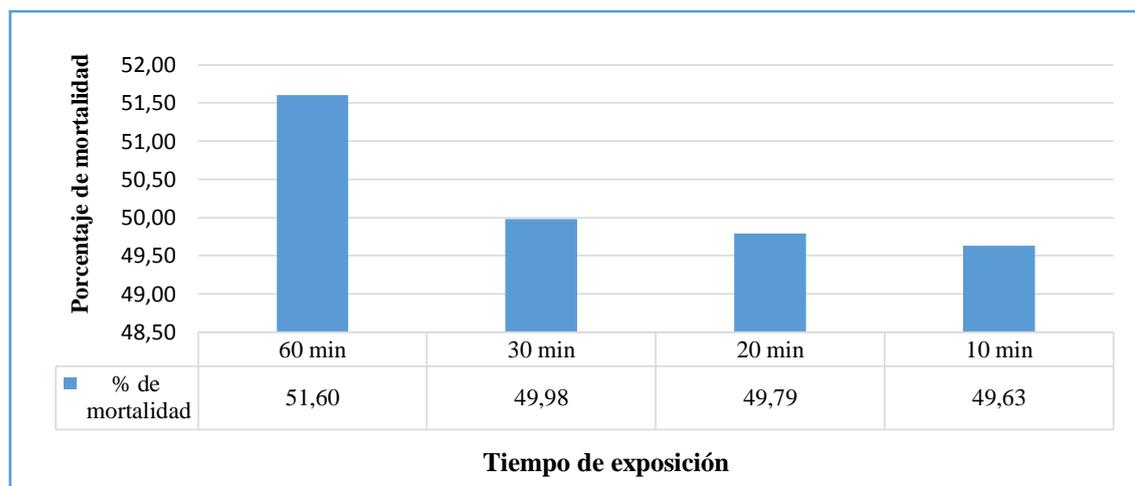


Gráfico 3.3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante los cuatro tiempos de exposición

Realizado por: Lizeth Alvear, 2017

En comparación con la investigación de Kwok, Plattner. R, Weisleder. D, y Wicklow (1992), de toxina del *Pleurotus ostreatus* NRRL3526 que inmovilizó el 95% de los nematodos (*Panagrellus*

redivivus) dentro de 1 hora a 300 ppm de concentración, se puede indicar que se tiene el mismo tiempo de exposición no por eso se debe obtener el mismo porcentaje de mortalidad porque hay otras variantes para el resultado del porcentaje de muerte como puede ser la concentración, la forma de obtener el extracto para la exposición sobre los nematodos.

3.1.5 **Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante la interacción entre extractos y concentraciones del *Pleurotus ostreatus***

El Grafico 4.3 muestra el mayor porcentaje de mortalidad de las cuatro concentraciones que fueron de 75, 50, 25 y 12µl del extracto etanólico del *Pleurotus ostreatus*, quedándose en el grupo A, y para el extracto acuoso el que causo mayor muerte fue el 75 y 50 µl de extracto encontrándose en el grupo B, dado a esto en el grupo C se compartieron las concentración de 12, 25,50µl de extracto acuosos quienes causaron menor muerte en las especies de nematodos *Passalurus sp* y *Meloidogyne sp.* (Tabla 5.3)

Tabla 5.3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos a causas de las cuatro concentraciones del extracto etanólico y acuoso *Pleurotus ostreatus*.

| Extractos | Concentraciones | % de mortalidad | Nivel | | |
|------------------|------------------------|------------------------|--------------|---|---|
| Etanólico | 75 µl | 99,29 | A | | |
| Etanólico | 50 µl | 99,13 | A | | |
| Etanólico | 25 µl | 99,04 | A | | |
| Etanólico | 12 µl | 98,06 | A | | |
| Acuoso | 75 µl | 2,63 | | B | |
| Acuoso | 50 µl | 1,75 | | B | C |
| Acuoso | 25 µl | 0,62 | | | C |
| Acuoso | 12 µl | 0,58 | | | C |

Con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

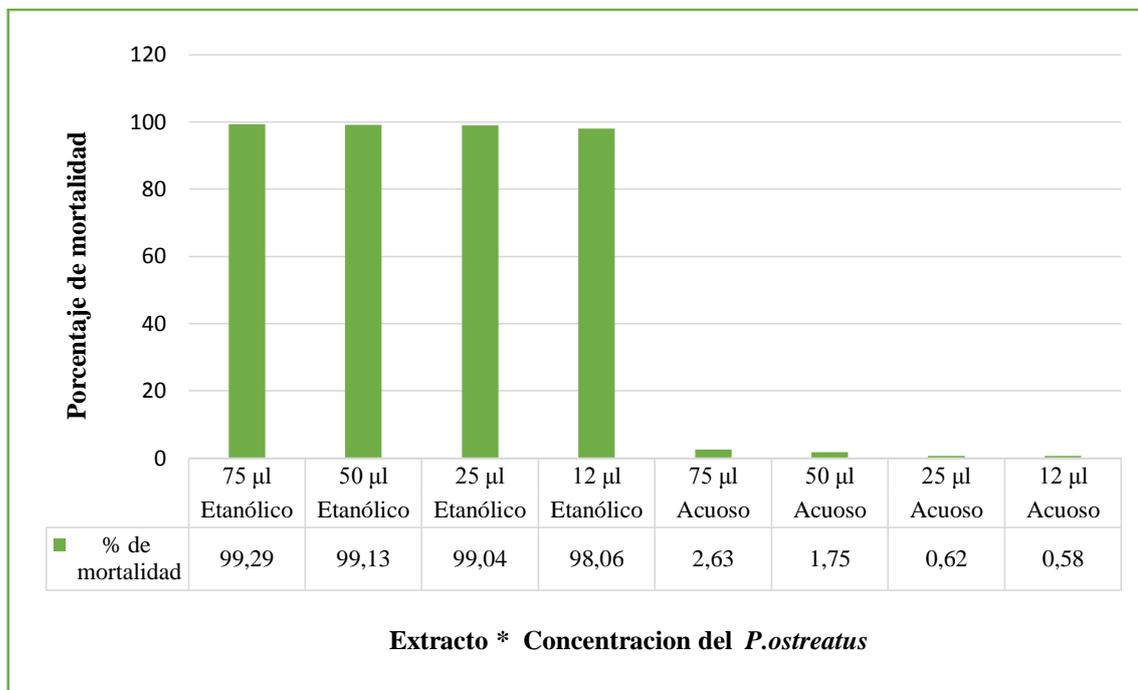


Gráfico 4.3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos para la interacción entre el extracto etanólico y acuoso y las cuatro concentraciones del extracto

Realizado por: Lizeth Alvear, 2017

El trabajo de Sierra Janeth, 2014, demuestra que el tratamiento de *P. ostreatus* a las 72 horas en la dosis de 75 gramos fue la que presentó un mayor porcentaje de individuos muertos con el 46.8% de mortalidad, en comparación con la concentración fue superior a la que se utilizó en el ensayo, pero así se obtuvo el 99,29% de muerte de las dos especies de nematodos y el tiempo de exposición del trabajo fue menor al de la investigación con la que fue comparado.

3.1.6 *Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante la interacción entre extractos y tiempo*

Mediante la prueba de Tukey para la interacción entre los extractos etanólico y acuoso del *Pleurotus ostreatus* frente a los diferentes tiempos de exposición que se tomaron en cuenta (Tabla 6.3), el mayor porcentaje de mortalidad en las dos especies de nematodos fue con el extracto etanólico, en los 60,30,20 y 10min de exposición con el 99,42% a 98,79% el cual nos proporciona al nivel A. Distinto a lo que pasa con el extracto acuoso ya que el mayor porcentaje de individuos muertos es de 3.79% en una exposición de 60 min con una nivel B y para los demás tiempos de 30 ,20 y 10min quedándose en el nivel C. (Gráfico 5.3)

Tabla 6.3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos para la interacción extractos etanólico, acuoso y los cuatro tiempos de exposición.

| Extractos | Tiempo | % de mortalidad | Grupo | | |
|-----------|--------|-----------------|-------|---|---|
| Etanólico | 60 min | 99,42 | A | | |
| Etanólico | 30 min | 99,21 | A | | |
| Etanólico | 20 min | 99,00 | A | | |
| Etanólico | 10 min | 98,79 | A | | |
| Acuoso | 60 min | 3,79 | | B | |
| Acuoso | 30 min | 0,75 | | | C |
| Acuoso | 20 min | 0,58 | | | C |
| Acuoso | 10 min | 0,46 | | | C |

Con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

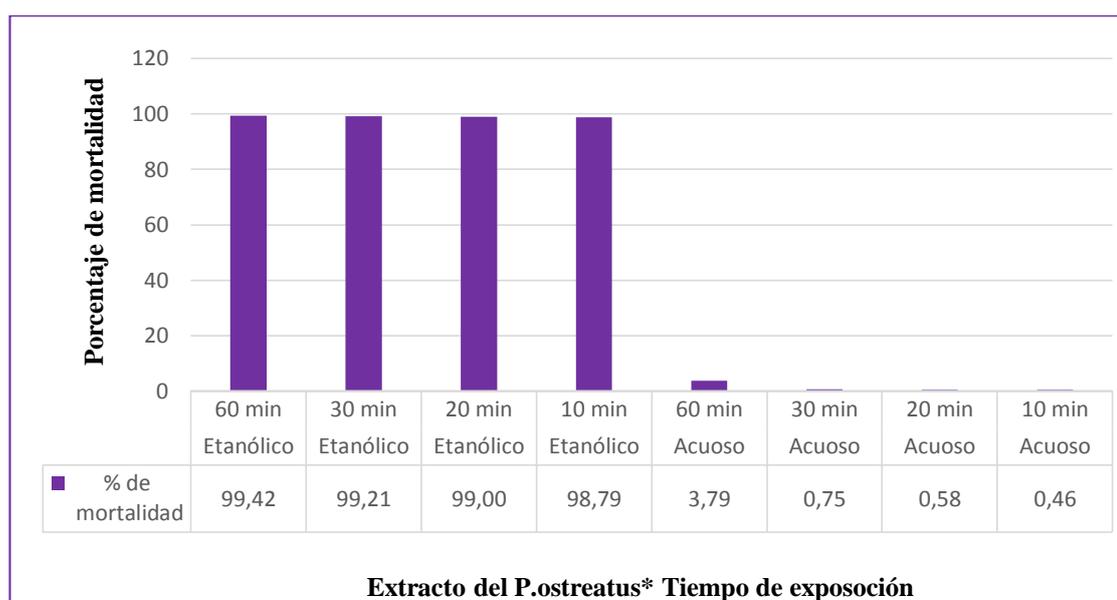


Gráfico 5.3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos para la interacción extractos etanólico, acuoso y los cuatro tiempos de exposición.

Realizado por: Lizeth Alvear, 2017

En la investigación de Kwok, Plattner.R, Weisleder.D, y Wicklow (1992), concluyen que la toxina del *Pleurotus ostreatus* inmoviliza hasta el 95% de los nematodos (*Panagrellus redivivus*) dentro de 1 hora a 300 ppm de concentración, comparando con el análisis del extracto etanólico obtuvieron un alto porcentaje de mortalidad de los nematodos, en un mismo tiempo de exposición.

3.1.7 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos mediante la interacción entre concentración de los extractos y el tiempo de exposición

El porcentaje de mortalidad de los nematodos *Passalurus sp* y *Meloidogyne sp*, mediante la interacción entre el tiempo de exposición y las concentraciones de los extractos etanólico y acuoso fueron altamente significativo $p = >0.0001$ (Tabla 1.3), lo cual se consiguió el 54 % y 52,25% de muerte, con la concentración de 75 μl y el 50 μl de los extractos del *Pleurotus ostreatus* durante 60 min por lo que se encontraron en el grupo A. Por otro lado, para las concentraciones de 12, 25, 50 y 75 μl en los tiempos de exposición de 30, 20 y 10 min se encuentran en el grupo B. (Tabla 7.3 y Grafico 6.3)

Tabla 7.3 Porcentaje de mortalidad para las dos especies de nematodos a causa de los cuatro tiempos de exposición y los extractos etanólico y acuoso

| Concentración | Tiempo | % de mortalidad | Grupo | |
|------------------|--------|-----------------|-------|---|
| 75 μl | 60 min | 54,00 | A | |
| 50 μl | 60 min | 52,25 | A | |
| 25 μl | 60 min | 50,17 | | B |
| 75 μl | 30 min | 50,17 | | B |
| 50 μl | 30 min | 50,00 | | B |
| 12 μl | 60 min | 50,00 | | B |
| 25 μl | 30 min | 49,92 | | B |
| 75 μl | 20 min | 49,92 | | B |
| 50 μl | 20 min | 49,83 | | B |
| 12 μl | 30 min | 49,83 | | B |
| 75 μl | 10 min | 49,75 | | B |
| 25 μl | 20 min | 49,75 | | B |
| 50 μl | 10 min | 49,67 | | B |
| 25 μl | 10 min | 49,67 | | B |
| 12 μl | 20 min | 49,58 | | B |
| 12 μl | 10 min | 49,50 | | B |

Con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

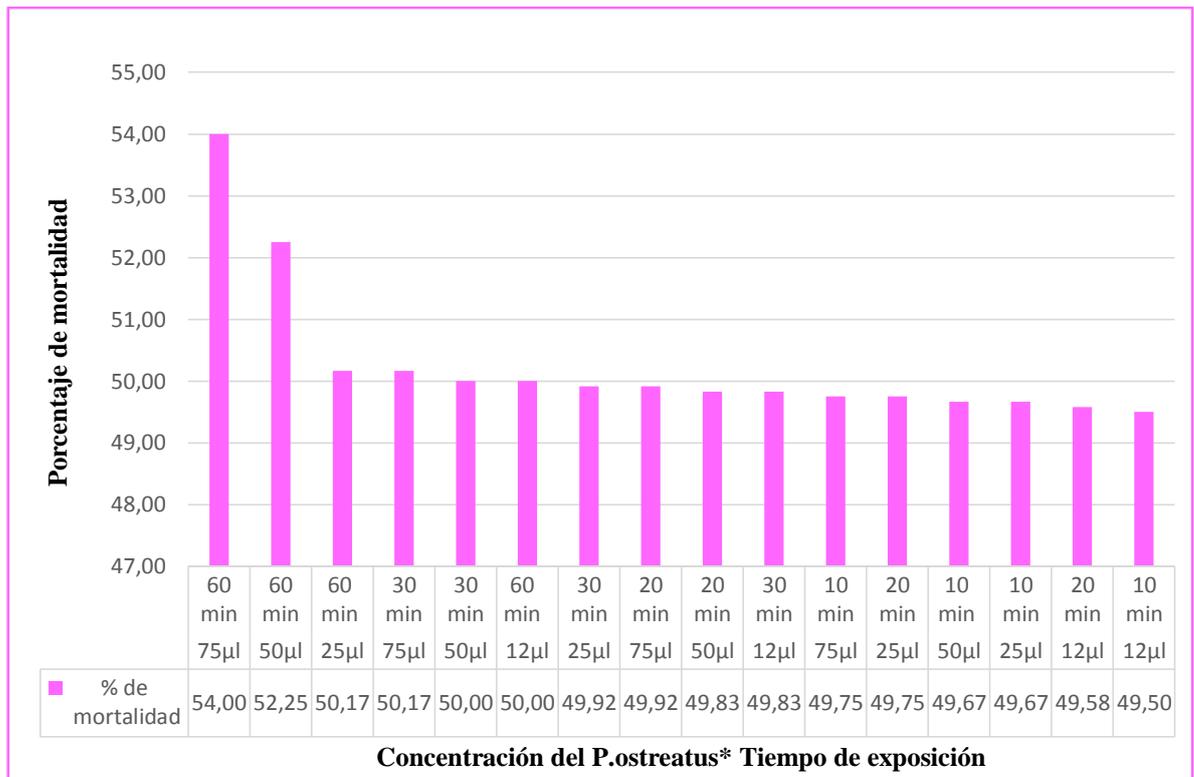


Gráfico 6.3 Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos para la interacción entre las cuatro concentraciones y los cuatro tiempos de exposición.

Realizado por: Lizeth Alvear, 2017

De la misma manera se realiza la comparación con otra investigación en el caso de Sierra Janeth, 2014, demuestra que el tratamiento de *P. ostreatus* a las 72 horas en la dosis de 75 gramos fue la que presentó un mayor porcentaje de individuos muertos con el 46.8% de mortalidad, la cual varia ya que la concentración más significativa en el trabajo fue de 75µl y el tiempo de exposición de 60 min cual fue otra variante, pero así se obtuvo el 54 % de mortalidad de los nematodos *Passalurus sp* y *Meloidogyne sp*.

CONCLUSIONES

- La mayor actividad nematicida se encontró en el extracto etanólico que se obtuvo el 99.10% de mortalidad de los nematodos *Passalurus sp* y *Meloidogyne sp*, en cambio con el extracto acuoso la mortalidad fue de 1.40%.
- El mayor porcentaje de mortalidad de las dos especies de nematodos fue el 51,60% durante 60 min de exposición, seguido de los 30 min con el 49,89% de muerte por los extractos etanólico y acuoso del *Pleurotus ostreatus*.
- Referente a las concentraciones de los extractos del *Pleurotus ostreatus*, la concentración de mayor efectividad fue de 75 µl del extracto acuosos y etanólico con el 50,96% de mortalidad de los *Passalurus sp* y *Meloidogyne sp*, seguido del 50 µl de los extractos con el 50.44% de muerte de los nematodos.

RECOMENDACIONES

- Realizar nuevas investigaciones con otras especies de nematodos y diferentes concentraciones del extracto del hongo *Pleurotus ostreatus*.
- Se necesitan investigaciones sobre actividad nematicida de *Pleurotus ostreatus* y buscar otras alternativas en bacterias, plantas que tengan acción nematici

BIBLIOGRAFÍA:

AGUINAGA BÓSQEZ, Paulina. *Evaluación de cuatro sustratos para la producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) en tres ciclos de producción en la zona de Tambillo, provincia de Pichincha.* [En línea]. (Tesis) (Pre-grado). Escuela Politécnica Nacional Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Quito (EC). 2012. [Consulta: 24 de abril del 2017]. Disponible: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/4663/1/CD-4295.pdf>

AGRIOS, George. *Fitopatología. Enfermedades de las plantas ocasionadas por nematodos.* Mexico.Limusa.pp.661-72

ALDER, Maite & ZUBILLAGA, María. *Alternativa de diversificación productiva para los valles Patagónicos.* [En línea]. Argentina. 2014. p.9 [Consulta: 25/05/2017]. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-grgolas__una_alternativa_de_diversificacin_para_los_v.pdf

ARMENDÁRIZ, Ignacio; et al. QUIÑA, Diana. *Nematodos fitopatógenos y sus estrategias de control.* [En línea]. Quito: David Andrade. Aguirre, 2015. [Consulta: 24 de abril del 2017]. ISBN: 978-9978-301-63-0. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/284185706_nematodos_fitopatogenos_y_sus_estrategias_de_control

BARRON, G. y THORN, R. "Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*". *Canadian Journal of Botany.* [En línea].1987.65, pp. 774-778. [Consulta: 27/07/2017]. ISSN 10.1139/b87-103.Disponible en: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/b87-103>

CARMONA, Gustavo, et al. Hernández, P. "Mortalidad de plántulas de "mangle negro" *Avicennia germinans* (Avicenniaceae) por nematodos (*Meloidogyne*) y su control bajo condiciones de vivero". *Revista Científica Biológico-Agropecuaria Tuxpan.* [En línea]. 2014. *Mexico.*2 (4). pp. 854-855 ISSN: 2007-6940.[Consulta: 21/09/2017].Disponible en: <http://132.248.9.34/hevila/RevistabiologicoagropecuariaTuxpan/2014/no4/17.pdf>

CASACA Ángel. *Guía tecnológica de frutas y vegetales. El cultivo de lechuga.* [En línea]. Costa Rica: Elena Sierra, 2005. [25/05/ 2017]. Disponible en: <http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/2792/lechuga.pdf>

CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes). *Método de Control Biológico.* [En línea]. Argentina: Buenos Aires. 13 del febrero del 2017. [Consulta: 21/09/2017]. Disponible en: <http://www.casafe.org/metodos-de-control-biologico/>

CRESCENCIO, Eduardo. *Taxonomía de Nematodos.* [En línea]. México, 2015. [Consulta: 28/09/2017]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/eduardocrescencioarredondo/taxonomia-de-nematodos>

CRUZ, D; et al. LÓPEZ DE LEÓN, E. “Guía técnica de producción de hongos comestibles de la especie *Pleurotus ostreatus.*” *Journal of Agriculture and Environment for International Development.* [En línea]. Guatemala. 2010, (3-4). Pp. 141-142. [Consulta: 12 de abril del 2017]. Disponible: <http://www.iao.florence.it/ojs/index.php/JAEID/article/view/16/18>

DIEZ ROJO, M.A; et al. LÓPEZ, J. Organismos para el control de patógenos en los cultivos protegidos. Prácticas culturales para una agricultura sostenible. Alternativas no químicas para el manejo de nematodos fitoparásitos. [En línea]. España: Fundación Cajamar, 2010. [Consulta: 28/05/2017]. Disponible en: <http://www.publicacionescajamar.es/pdf/series-tematicas/agricultura/organismos-para-el-control-de-patogenos.pdf>

EOL. *Taxonomía Passalurus sp.* [En línea]. Encyclopedia of life. 2013.[Consulta: 28/09/2017]. Disponible en: <http://eol.org/pages/4963887/names>

ESCOBAR, Cecilia. *Determinación de especies y prototipos de Meloidogyne, en kiwi (Actinidia deliciosa) y tomate (Lycopersicum esculentum), mediante el test de hospederos diferenciales.* [En línea]. (Tesis). Universidad de Chile. Facultad de ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 2006. p.10. [Consulta: 28/09/2017]. Disponible en: http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/101835/escobar_c.pdf?sequence=4

FUENTES Flor, et al. MENDOZA Rosa. *Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejos.* [En línea]. Lima. Instituto Nacional de Salud, 2010. [24 de abril 2017]. ISBN 978-9972-857-80-5. Disponible en:

<http://repositorio.ins.gob.pe/bitstream/handle/INS/116/CNPB-0001.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

GUARNIZO, Anderson & MARTÍNEZ, Pedro. *Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida. Extractor Soxhlet.* [En línea]. Colombia (CO): Elizcom S.A.S. p.71, 2009. [Consulta: 24 de abril del 2017]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=Otm5wsEeKYEC&pg=PA65&hl=es&source=gbs_toc_r&cad=3#v=onepage&q&f=false

GUTIÉRREZ GALINDO, Juan. “Enfermedades parasitarias más importantes del conejo: Oxiuridosis (*Passalurosis*)”. [En línea].Revista *Cunicultura. Barcelona*: Gutiérrez Juan, 2015. [Consulta: 12 de abril del 2017]. Disponible en: <http://cunicultura.com/2015/09/enfermedades-parasitarias-mas-importantes-del-conejo-oxiuridosis-passalurosis>

HEYDARI, R.; POURJAM, E. y GOLTAPPEH, E. M. *Antagonistic effect of some species of Pleurotus on the root-knot nematode, Meloidogyne javanica in vitro.* *Plant Pathology Journal* [En línea], 2006, 5, 173-177. [Consulta: 16/08/2017]. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012054187,http://scialert.net/qredirect.php?doi=ppj.2006.173.177&linkid=pdf>

JAPON, José. *La lechuga.* Caracteres botánicos y agronómicos. [En línea]. Publicaciones de extensión agraria. Madrid. pp. 2-3. ISBN 84-341-0124-6. [Consulta: 28 de mayo del 2017]. Disponible en: http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1977_10.pdf

JARAMILLO Jorge. *Modelo Tecnológico para Lechuga en el Buenas Prácticas Agrícolas Bajo el Cultivo de Oriente Antioqueño.* [En línea].Colombia: Paula Andrea Aguilar, 2016. [Consulta: 25/05/2017]. ISBN: 978-958-8955-10-0. Disponible en: <http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20DEL%20CULTIVO%20DE%20LA%20LECHUGA.pdf>

KWOK, O. C. H; et al. PLATTNER, R. “A nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526”. *Journal of Chemical Ecology.* [En línea]. (Vol. 18), 1992. pp 127–136 [24 de Abril 2017]. Número Online ISSN 1573-1561. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00993748?LI=true> y

LÓPEZ, Carlos. *Manejo holístico en la producción de hongos comestibles (Pleurotus ostreatus) en el semi desierto.* [En línea]. (Tesis) (Post -grado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Agronomía. México. (MX). 2011. [Consulta: 24 de abril del 2017]. Disponible:

<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6415/T18723%20LÓPEZ%20PEREZ%2c%20CARLOS%20ANTONIO%20%2061853.pdf?sequence=1>

LÓPEZ-LLORCA, Luis V & HANS-BÖRJE, Jansson. *Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos.* [En línea]. Suecia. Cuadernos de Biodiversidad. 2001. pp. 12-14. [24 de abril 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/39436054_Biodiversidad_del_suelo_control_biologico_de_nematodos_fitopatogenos_por_hongos_nematofagos

MANUAL CONTROL BIOLÓGICO. *Manual para la producción de: Spodoptera frugiperda, Telenomus remus Virus de la Polihedrosis Nuclear (VPN) TRICHOZAM, BAZAM y VERZAM.* [En línea]. Honduras.2005. [Consulta: 21/09/2017]. Disponible en: <https://docgo.org/manual-control-biologico>

MÁRQUEZ, Manuel. “Conejos, conoce sus características, hábitos y costumbres”. *Mamíferos: revista digital Animales y Mascotas.* [En línea]. 2014. España. [Consulta: 24 de abril 2017]. ISSN 2529-895X. Disponible en: <https://mamiferos.paradai-sphynx.com/lagomorfos/conejos/caracteristicas-y-habitos.htm>

MENDOZA, Pedro; VALERO, Rosa. *Uso de hongos nematófagos: una Herramienta biotecnológica para el control de nematodos parásitos del ganado.* [En línea]. México: Rodrigo Rosario. 2009. [Consulta: 28/05/2017]. ISBN. 978-607-425-293-4. Disponible en: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3142/FolletoTecnicoN7.pdf?sequence=1> <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3142>

MORALES, Gustavo; et al. JIMÉNEZ, Delia. *Técnicas de diagnóstico ante mortem de enfermedades parasitarias en rumiantes.* [En línea]. Venezuela.2006. [Consulta: 28/05/2017]. Disponible en: <http://www.indicepecuario.com/2016/05/13/tecnicas-de-diagnostico-ante-mortem-de-enfermedades-parasitarias-en-rumiantes/>

NICHOLLS, Clara. *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico.* [En línea]. Medellín- Colombia: Universidad de Antioquia.2008.

pp. 1-2 [Consulta: 28/05/2017]. ISBN: 978-958-714-186-3. Disponible en: <https://www.socla.co/wp-content/uploads/2014/ClaraNicholls.pdf?iv=155>

NÚÑEZ, Carlos. *Extracciones con equipo Soxhlet. Explicación de la operación de extracción.* [En línea]. 2008. pp. 2-4. [Consulta: 24 de abril del 2017]. Disponible en: <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>

PÉREZ GONZÁLEZ, Luis. *Estudio fitoquímico biodirigido de las plantas con potencial actividad insecticida trichilia havanensis y croton ciliatoglanduliferus.* Tesis Licenciatura. Ciencias Farmacéuticas. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Universidad de las Américas Puebla. Mayo. 2006. [Consulta: 28/05/2017]. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lcf/perez_g_le/

PIEDRA,NARANJO, Ricardo. *Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias.* [En línea].Tecnología en Marcha, (Vol. 21-1), Enero-Marzo 2008, pp. 123-132. [24 de abril 2017]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4835677.pdf>

PINEDA, Danny. *Respuesta del cultivo de lechuga (Lactuca sativa l) a la aplicación de tres abonos líquidos a tres dosis en la zona de Pimampiro, Provincia de Imbabura.* [En línea]. (Tesis). (Pregrado). Universidad técnica de Babahoyo. Facultad ciencias Pecuarias. Escuela Ingeniería Agronómica. Ecuador.2011. [Consulta: 12 de abril del 2017]. Disponible en: <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/49000/118/6/T-UTB-FACIAG-AGR-000028.pdf>

QUIROZ ROMERO, Héctor. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos.* [En línea]. México: Limusa, S.A de C.V. grupo Noriega.2005. [Consulta: 20 septiembre 2017]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=xRxxXaI1Y6EC&pg=PA428&lpg=PA428&dq=Los+huevos+son+puestos+en+el+recto,+en+estado+de+bl%C3%A1stula,+en+donde+evolucionan+al+estado+infestante+en+18-24+horas,+salen+con+las+heces+y+permanecen+viables+durante+alg%C3%BAntiempo.+La+infestaci%C3%B3n+se+realiza+por+medio&source=bl&ots=k-fOdtYtlO&sig=J_vUDE10z1BnLpnfW9YyK69i6hA&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj8iJWmu7DXAhUGRCYKHWfRA4UQ6AEIJDA#v=onepage&q&f=false

RAVERA, C; et al. BETTERA, C. *Aprovechamiento de los residuos agrícolas. Procesamiento de la caja del maní, su conversión biológica y productos.* [En línea]. Argentina. 2008. pp. 4-5. [Consulta: 24 de abril del 2017]. Disponible en: <http://www.redisa.net/doc/artSim2008/tratamiento/A22.pdf>

SALAS, Julio. *Nematodos (Nematelmintos = gusanos redondos).* [En línea]. Estados Unidos. California: Julio Salas, 2017. [Consulta: 28/05/2017]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/94223329/Nematodos>

SÁNCHEZ, JOSÉ & ROYSE, DANIEL. La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus sp.* [En línea]. México: Sánchez, José & Royse, Daniel, 2017. [Consulta: 28/05/2017]. Disponible en: http://aleph.ecosur.mx:8991/exlibris/aleph/a22_1/apache_media/UKJIE9C51543LYAR2PDS564RQBLGNY.pdf

SÁNCHEZ, A. *Control ecológico de plagas y enfermedades. Cultivo ecológico aloe vera.* [En línea]. Colombia. 04 de agosto del 2017. [Consulta: 21/09/2017]. Disponible en: <https://docgo.org/control-ecologico-de-plagas-y-enfermedades>

SERRANO, Leobardo & GALINDO, Enrique. *Control Biológico.* Academia Mexicana de Ciencia. [En línea]. México. 2017. [Consulta: 21/09/2017]. Disponible en: http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=81:control-biologico-de-organismos-fitopatogenos-un-reto-multidisciplinario&catid=36

SIERRA MONROY, Janeth. *Evaluación de la acción nematocida in vitro e in vivo de especies de Pleurotus spp., sobre los nematodos Meloidogyne spp. y Radopholus spp. Asociados a los cultivos de tomate y plátano.* [En línea]. (Tesis). (Maestría). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Posgrados, Colombia, 2014. pp.15-16. [Consulta: 12 de abril del 2017]. Disponible en: http://www.bdigital.unal.edu.co/48613/1/Janeth_Alexandra_Sierra.pdf

TIPANTASING, Liliana. “*Estudio de pre factibilidad para la producción y comercialización de carne de conejo (Oryctolagus cuniculus) en la Sierra Centro del Ecuador*”. (Tesis) (Pos-grado). Universidad San Francisco de Quito. Colegio

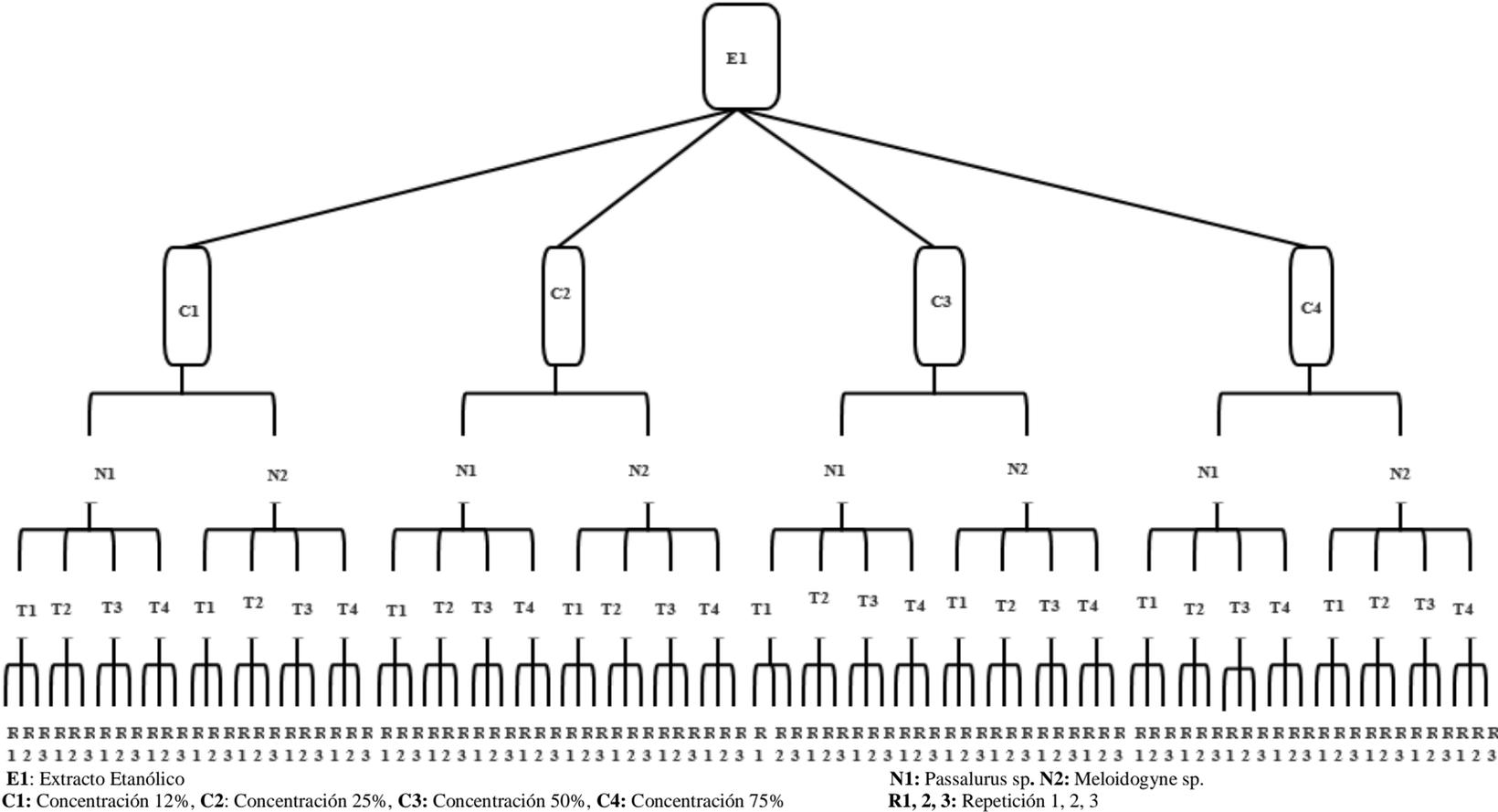
de ciencias e Ingeniería. Quito-Ecuador. 2014. [Consulta: 12 de abril del 2017]. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3338/1/110824.pdf>

TRIVIÑO, Carmen. *Control biológico del nematodo agallador Meloidogyne spp. con la bacteria Pasteuria penetrans en campos de producción.* [En línea]. Ecuador. 2003. [Consulta: 12 de abril del 2017]. Disponible en: http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Control_biologico_nematodo_agallador_Meloidogyne_spp.pdf

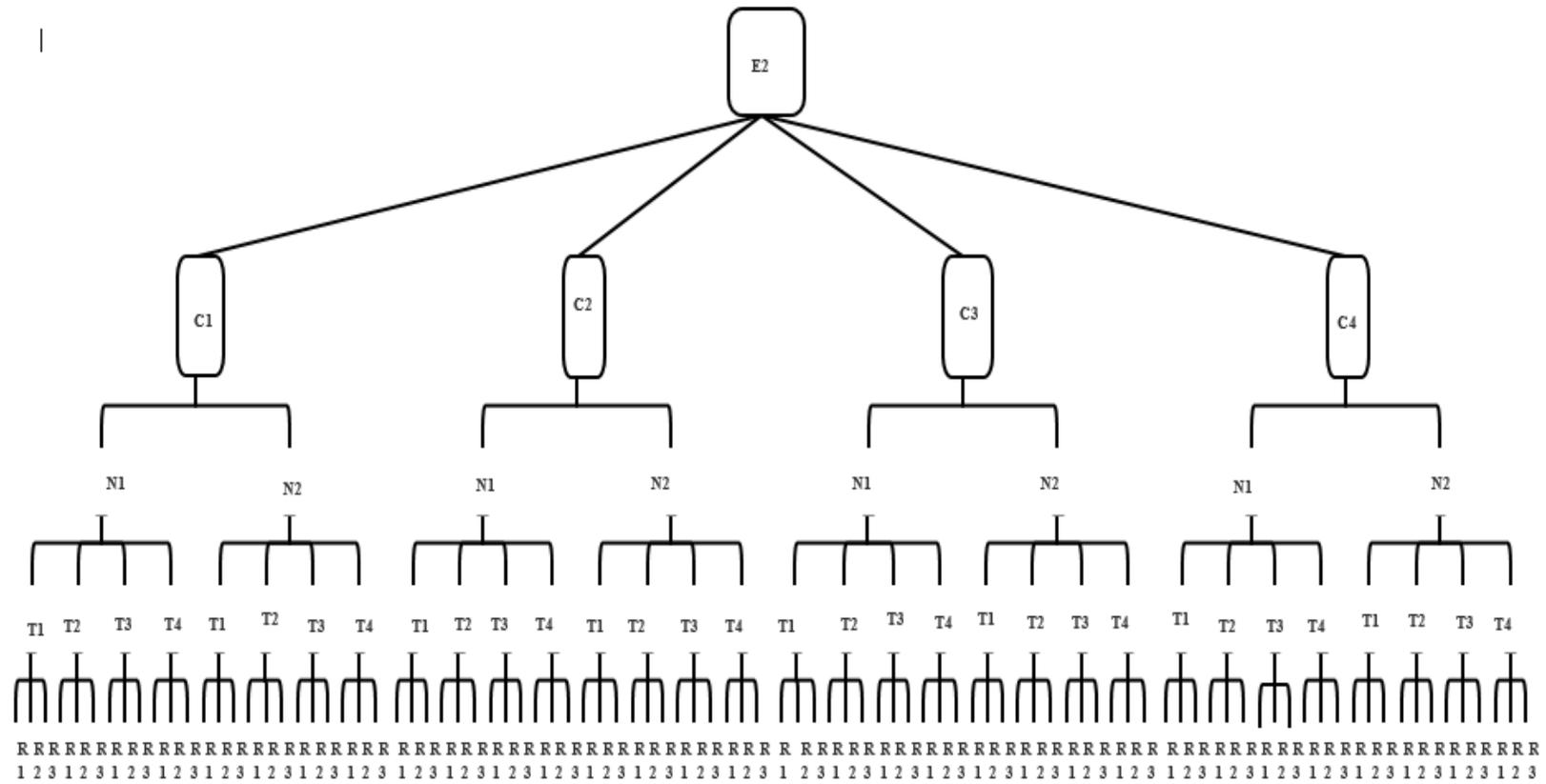
ZÁRATE, Santiago. *Búsqueda de los genes de resistencia Mi-1 y Mi-3 al nematodo formador de nudo Meloidogyne sp. En varias especies silvestres de la familia solanaceae del Ecuador.* [En línea]. (Tesis). (Pregrado). Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de ciencias de la vida Ingeniería en Biotecnología. Quito, Ecuador. 2008. pp. 16-17. [Consulta: 28/05/2017]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/1042/1/T-ESPE-026698.pdf>

ANEXOS

ANEXO A. Tratamiento para el extracto etanólico



ANEXO B. Tratamiento para el extracto acuoso



E2: Extracto Acuoso

C1: Concentración 12%, **C2:** Concentración 25%, **C3:** Concentración 50%, **C4:** Concentración 75%

N1: *Passalurus* sp. **N2:** *Meloidogyne* sp.

R1, 2, 3: Repetición 1,

ANEXO C. Códigos de los tratamientos en cajas Petri

| Código de los tratamientos | | | |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|
| E1C1N1T1R1 | E1C2N1T1R1 | E1C3N1T1R1 | E1C4N1T1R1 |
| E1C1N1T1R2 | E1C2N1T1R2 | E1C3N1T1R2 | E1C4N1T1R2 |
| E1C1N1T1R3 | E1C2N1T1R3 | E1C3N1T1R3 | E1C4N1T1R3 |
| E1C1N1T2R1 | E1C2N1T2R1 | E1C3N1T2R1 | E1C4N1T2R1 |
| E1C1N1T2R2 | E1C2N1T2R2 | E1C3N1T2R2 | E1C4N1T2R2 |
| E1C1N1T2R3 | E1C2N1T2R3 | E1C3N1T2R3 | E1C4N1T2R3 |
| E1C1N1T3R1 | E1C2N1T3R1 | E1C3N1T3R1 | E1C4N1T3R1 |
| E1C1N1T3R2 | E1C2N1T3R2 | E1C3N1T3R2 | E1C4N1T3R2 |
| E1C1N1T3R3 | E1C2N1T3R3 | E1C3N1T3R3 | E1C4N1T3R3 |
| E1C1N1T4R1 | E1C2N1T4R1 | E1C3N1T4R1 | E1C4N1T4R1 |
| E1C1N1T4R2 | E1C2N1T4R2 | E1C3N1T4R2 | E1C4N1T4R2 |
| E1C1N1T4R3 | E1C2N1T4R3 | E1C3N1T4R3 | E1C4N1T4R3 |
| | | | |
| E1C1N2T1R1 | E1C2N2T1R1 | E1C3N2T1R1 | E1C4N2T1R1 |
| E1C1N2T1R2 | E1C2N2T1R2 | E1C3N2T1R2 | E1C4N2T1R2 |
| E1C1N2T1R3 | E1C2N2T1R3 | E1C3N2T1R3 | E1C4N2T1R3 |
| E1C1N2T2R1 | E1C2N2T2R1 | E1C3N2T2R1 | E1C4N2T2R1 |
| E1C1N2T2R2 | E1C2N2T2R2 | E1C3N2T2R2 | E1C4N2T2R2 |
| E1C1N2T2R3 | E1C2N2T2R3 | E1C3N2T2R3 | E1C4N2T2R3 |
| E1C1N2T3R1 | E1C2N2T3R1 | E1C3N2T3R1 | E1C4N2T3R1 |
| E1C1N2T3R2 | E1C2N2T3R2 | E1C3N2T3R2 | E1C4N2T3R2 |
| E1C1N2T3R3 | E1C2N2T3R3 | E1C3N2T3R3 | E1C4N2T3R3 |
| E1C1N2T4R1 | E1C2N2T4R1 | E1C3N2T4R1 | E1C4N2T4R1 |
| E1C1N2T4R2 | E1C2N2T4R2 | E1C3N2T4R2 | E1C4N2T4R2 |
| E1C1N2T4R3 | E1C2N2T4R3 | E1C3N2T4R3 | E1C4N2T4R3 |

Continuación

| | | | |
|------------|------------|------------|------------|
| E2C1N1T1R1 | E2C2N1T1R1 | E2C3N1T1R1 | E2C4N1T1R1 |
| E2C1N1T1R2 | E2C2N1T1R2 | E2C3N1T1R2 | E2C4N1T1R2 |
| E2C1N1T1R3 | E2C2N1T1R3 | E2C3N1T1R3 | E2C4N1T1R3 |
| E2C1N1T2R1 | E2C2N1T2R1 | E2C3N1T2R1 | E2C4N1T2R1 |
| E2C1N1T2R2 | E2C2N1T2R2 | E2C3N1T2R2 | E2C4N1T2R2 |
| E2C1N1T2R3 | E2C2N1T2R3 | E2C3N1T2R3 | E2C4N1T2R3 |
| E2C1N1T3R1 | E2C2N1T3R1 | E2C3N1T3R1 | E2C4N1T3R1 |
| E2C1N1T3R2 | E2C2N1T3R2 | E2C3N1T3R2 | E2C4N1T3R2 |
| E2C1N1T3R3 | E2C2N1T3R3 | E2C3N1T3R3 | E2C4N1T3R3 |
| E2C1N1T4R1 | E2C2N1T4R1 | E2C3N1T4R1 | E2C4N1T4R1 |
| E2C1N1T4R2 | E2C2N1T4R2 | E2C3N1T4R2 | E2C4N1T4R2 |
| E2C1N1T4R3 | E2C2N1T4R3 | E2C3N1T4R3 | E2C4N1T4R3 |
| | | | |
| E2C1N2T1R1 | E2C2N2T1R1 | E2C3N2T1R1 | E2C4N2T1R1 |
| E2C1N2T1R2 | E2C2N2T1R2 | E2C3N2T1R2 | E2C4N2T1R2 |
| E2C1N2T1R3 | E2C2N2T1R3 | E2C3N2T1R3 | E2C4N2T1R3 |
| E2C1N2T2R1 | E2C2N2T2R1 | E2C3N2T2R1 | E2C4N2T2R1 |
| E2C1N2T2R2 | E2C2N2T2R2 | E2C3N2T2R2 | E2C4N2T2R2 |
| E2C1N2T2R3 | E2C2N2T2R3 | E2C3N2T2R3 | E2C4N2T2R3 |
| E2C1N2T3R1 | E2C2N2T3R1 | E2C3N2T3R1 | E2C4N2T3R1 |
| E2C1N2T3R2 | E2C2N2T3R2 | E2C3N2T3R2 | E2C4N2T3R2 |
| E2C1N2T3R3 | E2C2N2T3R3 | E2C3N2T3R3 | E2C4N2T3R3 |
| E2C1N2T4R1 | E2C2N2T4R1 | E2C3N2T4R1 | E2C4N2T4R1 |
| E2C1N2T4R2 | E2C2N2T4R2 | E2C3N2T4R2 | E2C4N2T4R2 |
| E2C1N2T4R3 | E2C2N2T4R3 | E2C3N2T4R3 | E2C4N2T4R3 |

E = Extracción T = Tiempo
 C = Concentración R = Repeticiones
 N = Nematodo

ANEXO D. Preparación de la muestra del *Pleurotus ostreatus*



ANEXO D.1. El hongo *Pleurotus ostreatus*



ANEXO D.3. Muestra triturada.



ANEXO D.4. Cartucho

ANEXO E. Obtención del extracto etanólico



ANEXO E.1 Extracción etanólico mediante el equipo Soxhlet



ANEXO E.2 Extracto concentrado por el rotavapor



ANEXO E.3 Extracto Etanólico

ANEXO F. Obtención del extracto acuoso



ANEXO F.1 Micelio del *P. ostreatus*



ANEXO F.2 Extracto acuoso del *P.O*



ANEXO F.3 Ext. acuoso

ANEXO G. Muestreo y extracción de nematodos *Passalurus sp.*



ANEXO G.1 Muestreo de estiércol de conejo



ANEXO G.2 Estiércol de conejo



ANEXO G.3 Extracción de nematodos estiércol de conejo - embudo de Baermann

ANEXO H. Muestreo y extracción de los nematodos *Meloidogyne sp.*



ANEXO H.1 Muestreo del suelo de la rizosfera de las lechugas

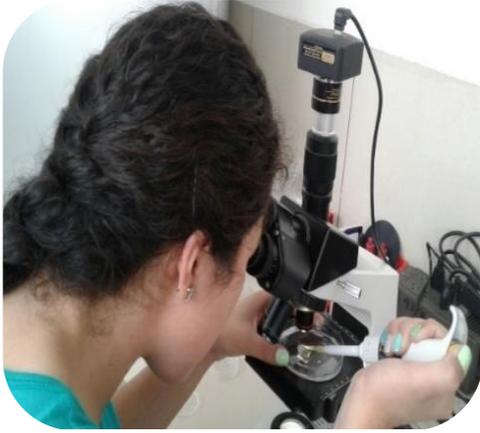


ANEXO H.2 Muestra de suelo de la rizosfera de la lechuga

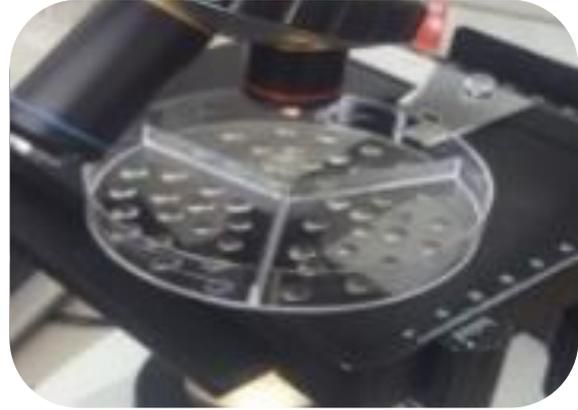


ANEXO H.3 Extracción de nematodos *Meloidogyne sp.* - Embudo de Baermann

ANEXO I. Selección y mortalidad de nematodos (*Passalurus sp.* *Meloidogyne sp.*)



ANEXO I.1 Selección de nematodos



ANEXO I.2 Nematodos seleccionados en la caja Petri.



ANEXO I.3 Colocar el extracto en los nematodos



ANEXO I.4 Extracto sobre los nematodos

ANEXO J. Mortalidad de los nematodos (*Passalurus sp.* *Meloidogyne sp.*)



ANEXO J.1 Los *Passalurus sp.*, con extracto etanólico.



ANEXO J.2 Los *Meloidogyne sp.* con extracto acuoso



ANEXO J.3 Los *Passalurus sp.*, con extracto acuoso.



ANEXO J.4 Los *Meloidogyne sp.*, con extracto acuoso

ANEXO K. Cantidad de *Passalurus sp* muertos

| Nematodo | <i>Passalurus sp.</i> | | | |
|------------------|-----------------------------|----------------|-------------------------------|--------------------------|
| Extractos | Concentraciones (µl) | Tiempos | Población de nematodos | Nematodos muertos |
| Etanólico | 12 | 10min | 30 | 30 |
| | | 20min | 30 | 30 |
| | | 30min | 30 | 30 |
| | | 60min | 30 | 30 |
| | 25 | 10min | 30 | 30 |
| | | 20min | 30 | 30 |
| | | 30min | 30 | 30 |
| | | 60min | 30 | 30 |
| | 50 | 10min | 30 | 30 |
| | | 20min | 30 | 30 |
| | | 30min | 30 | 30 |
| | | 60min | 30 | 30 |
| | 75 | 10min | 30 | 30 |
| | | 20min | 30 | 30 |
| | | 30min | 30 | 30 |
| | | 60min | 30 | 30 |
| Acuoso | 12 | 10min | 30 | 0 |
| | | 20min | 30 | 0 |
| | | 30min | 30 | 0 |
| | | 60min | 30 | 0 |
| | 25 | 10min | 30 | 0 |
| | | 20min | 30 | 0 |
| | | 30min | 30 | 0 |
| | | 60min | 30 | 0 |
| | 50 | 10min | 30 | 0 |
| | | 20min | 30 | 0 |
| | | 30min | 30 | 0 |
| | | 60min | 30 | 2 |
| | 75 | 10min | 30 | 0 |
| | | 20min | 30 | 0 |
| | | 30min | 30 | 0 |
| | | 60min | 30 | 3 |

ANEXO L Cantidad de *Meloidogyne sp.* muertos

| Nematodo | <i>Meloidogyne sp.</i> | | | |
|------------------|-----------------------------|----------------|-------------------------------|--------------------------|
| Extractos | Concentraciones (µl) | Tiempos | Población de nematodos | Nematodos muertos |
| Etanólico | 12 | 10min | 30 | 30 |
| | | 20min | 30 | 30 |
| | | 30min | 30 | 30 |
| | | 60min | 30 | 30 |
| | 25 | 10min | 30 | 30 |
| | | 20min | 30 | 30 |
| | | 30min | 30 | 30 |
| | | 60min | 30 | 30 |
| | 50 | 10min | 30 | 30 |
| | | 20min | 30 | 30 |
| | | 30min | 30 | 30 |
| | | 60min | 30 | 30 |
| | 75 | 10min | 30 | 30 |
| | | 20min | 30 | 30 |
| | | 30min | 30 | 30 |
| | | 60min | 30 | 30 |
| Acuoso | 12 | 10min | 30 | 0 |
| | | 20min | 30 | 0 |
| | | 30min | 30 | 0 |
| | | 60min | 30 | 0 |
| | 25 | 10min | 30 | 0 |
| | | 20min | 30 | 0 |
| | | 30min | 30 | 0 |
| | | 60min | 30 | 0 |
| | 50 | 10min | 30 | 0 |
| | | 20min | 30 | 0 |
| | | 30min | 30 | 0 |
| | | 60min | 30 | 1 |
| | 75 | 10min | 30 | 0 |
| | | 20min | 30 | 0 |
| | | 30min | 30 | 0 |
| | | 60min | 30 | 2 |

ANEXO M. Resultados del ensayo

| Extractos | Concentraciones | Nematodos | Tiempo | Repeticiones | Mortalidad |
|------------------|------------------------|------------------------|---------------|---------------------|-------------------|
| Etanólico | 12% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 1 | 96 |
| Etanólico | 12% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 2 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 3 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 1 | 97 |
| Etanólico | 12% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 2 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 3 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 1 | 97 |
| Etanólico | 12% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 2 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 3 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 1 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 2 | 98 |
| Etanólico | 12% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 3 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 1 | 96 |
| Etanólico | 12% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 2 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 3 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 1 | 96 |
| Etanólico | 12% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 2 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 3 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 1 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 2 | 98 |
| Etanólico | 12% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 3 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 1 | 100 |
| Etanólico | 12% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 2 | 97 |
| Etanólico | 12% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 3 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 1 | 96 |
| Etanólico | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 2 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 3 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 1 | 97 |
| Etanólico | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 2 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 3 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 1 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 2 | 98 |
| Etanólico | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 3 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 1 | 99 |
| Etanólico | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 2 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 3 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 1 | 96 |
| Etanólico | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 2 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 3 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 1 | 97 |
| Etanólico | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 2 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 3 | 100 |

Continuación

| | | | | | |
|-----------|-----|------------------------|---|---|-----|
| Etanólico | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 1 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 2 | 97 |
| Etanólico | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 3 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 1 | 100 |
| Etanólico | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 2 | 97 |
| Etanólico | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 3 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 1 | 97 |
| Etanólico | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 2 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 3 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 1 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 2 | 97 |
| Etanólico | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 3 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 1 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 2 | 98 |
| Etanólico | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 3 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 1 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 2 | 99 |
| Etanólico | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 3 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 1 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 2 | 96 |
| Etanólico | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 3 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 1 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 2 | 97 |
| Etanólico | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 3 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 1 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 2 | 97 |
| Etanólico | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 3 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 1 | 98 |
| Etanólico | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 2 | 100 |
| Etanólico | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 3 | 100 |
| Etanólico | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 1 | 97 |
| Etanólico | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 2 | 100 |
| Etanólico | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 3 | 100 |
| Etanólico | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 1 | 100 |
| Etanólico | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 2 | 98 |
| Etanólico | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 3 | 100 |
| Etanólico | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 1 | 100 |
| Etanólico | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 2 | 98 |
| Etanólico | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 3 | 100 |
| Etanólico | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 1 | 100 |
| Etanólico | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 2 | 99 |
| Etanólico | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 3 | 100 |
| Etanólico | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 1 | 100 |
| Etanólico | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 2 | 97 |
| Etanólico | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 3 | 100 |

Continuación

| | | | | | |
|-----------|-----|-----------------|---|---|-----|
| Etanólico | 75% | Meloidogyne sp. | 2 | 1 | 100 |
| Etanólico | 75% | Meloidogyne sp. | 2 | 2 | 97 |
| Etanólico | 75% | Meloidogyne sp. | 2 | 3 | 100 |
| Etanólico | 75% | Meloidogyne sp. | 3 | 1 | 100 |
| Etanólico | 75% | Meloidogyne sp. | 3 | 2 | 98 |
| Etanólico | 75% | Meloidogyne sp. | 3 | 3 | 100 |
| Etanólico | 75% | Meloidogyne sp. | 4 | 1 | 100 |
| Etanólico | 75% | Meloidogyne sp. | 4 | 2 | 99 |
| Etanólico | 75% | Meloidogyne sp | 4 | 3 | 100 |
| Acuoso | 12% | Passalurus sp | 1 | 1 | 0 |
| Acuoso | 12% | Passalurus sp | 1 | 2 | 1 |
| Acuoso | 12% | Passalurus sp | 1 | 3 | 0 |
| Acuoso | 12% | Passalurus sp | 2 | 1 | 0 |
| Acuoso | 12% | Passalurus sp | 2 | 2 | 1 |
| Acuoso | 12% | Passalurus sp | 2 | 3 | 0 |
| Acuoso | 12% | Passalurus sp | 3 | 1 | 0 |
| Acuoso | 12% | Passalurus sp | 3 | 2 | 1 |
| Acuoso | 12% | Passalurus sp | 3 | 3 | 0 |
| Acuoso | 12% | Passalurus sp | 4 | 1 | 2 |
| Acuoso | 12% | Passalurus sp | 4 | 2 | 0 |
| Acuoso | 12% | Passalurus sp | 4 | 3 | 0 |
| Acuoso | 12% | Meloidogyne sp. | 1 | 1 | 2 |
| Acuoso | 12% | Meloidogyne sp. | 1 | 2 | 0 |
| Acuoso | 12% | Meloidogyne sp. | 1 | 3 | 0 |
| Acuoso | 12% | Meloidogyne sp. | 2 | 1 | 2 |
| Acuoso | 12% | Meloidogyne sp. | 2 | 2 | 0 |
| Acuoso | 12% | Meloidogyne sp. | 2 | 3 | 0 |
| Acuoso | 12% | Meloidogyne sp. | 3 | 1 | 2 |
| Acuoso | 12% | Meloidogyne sp. | 3 | 2 | 0 |
| Acuoso | 12% | Meloidogyne sp. | 3 | 3 | 0 |
| Acuoso | 12% | Meloidogyne sp. | 4 | 1 | 3 |
| Acuoso | 12% | Meloidogyne sp. | 4 | 2 | 0 |
| Acuoso | 12% | Meloidogyne sp. | 4 | 3 | 0 |
| Acuoso | 25% | Passalurus sp | 1 | 1 | 1 |
| Acuoso | 25% | Passalurus sp | 1 | 2 | 0 |
| Acuoso | 25% | Passalurus sp | 1 | 3 | 0 |
| Acuoso | 25% | Passalurus sp | 2 | 1 | 2 |
| Acuoso | 25% | Passalurus sp | 2 | 2 | 0 |
| Acuoso | 25% | Passalurus sp | 2 | 3 | 0 |
| Acuoso | 25% | Passalurus sp | 3 | 1 | 2 |
| Acuoso | 25% | Passalurus sp | 3 | 2 | 0 |
| Acuoso | 25% | Passalurus sp | 3 | 3 | 0 |
| Acuoso | 25% | Passalurus sp | 4 | 1 | 0 |
| Acuoso | 25% | Passalurus sp | 4 | 2 | 3 |

Continuación

| | | | | | |
|--------|-----|------------------------|---|---|------|
| Acuoso | 25% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 3 | 0 |
| Acuoso | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 1 | 0 |
| Acuoso | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 2 | 1 |
| Acuoso | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 3 | 0 |
| Acuoso | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 1 | 0 |
| Acuoso | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 2 | 1 |
| Acuoso | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 3 | 0 |
| Acuoso | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 1 | 0 |
| Acuoso | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 2 | 2 |
| Acuoso | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 3 | 0 |
| Acuoso | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 1 | 0 |
| Acuoso | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 2 | 3 |
| Acuoso | 25% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 3 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 1 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 2 | 2 |
| Acuoso | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 3 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 1 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 2 | 2 |
| Acuoso | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 3 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 1 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 2 | 3 |
| Acuoso | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 3 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 1 | 6,67 |
| Acuoso | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 2 | 6,67 |
| Acuoso | 50% | <i>Passalurus sp</i> | 4 | 3 | 6,67 |
| Acuoso | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 1 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 2 | 1 |
| Acuoso | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 3 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 1 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 2 | 2 |
| Acuoso | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 3 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 1 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 2 | 0 |
| Acuoso | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 3 | 2 |
| Acuoso | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 1 | 3,33 |
| Acuoso | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 2 | 3,33 |
| Acuoso | 50% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 3 | 3,33 |
| Acuoso | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 1 | 0 |
| Acuoso | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 2 | 2 |
| Acuoso | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 1 | 3 | 0 |
| Acuoso | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 1 | 0 |
| Acuoso | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 2 | 0 |
| Acuoso | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 2 | 3 | 2 |
| Acuoso | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 1 | 0 |

Continuación

| | | | | | |
|--------|-----|------------------------|---|---|------|
| Acuoso | 75% | <i>Passalurus sp</i> | 3 | 2 | 3 |
| Acuoso | 75% | <i>Passalurus sp.</i> | 3 | 3 | 0 |
| Acuoso | 75% | <i>Passalurus sp.</i> | 4 | 1 | 10 |
| Acuoso | 75% | <i>Passalurus sp.</i> | 4 | 2 | 10 |
| Acuoso | 75% | <i>Passalurus sp.</i> | 4 | 3 | 10 |
| Acuoso | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 1 | 0 |
| Acuoso | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 2 | 1 |
| Acuoso | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 1 | 3 | 0 |
| Acuoso | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 1 | 0 |
| Acuoso | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 2 | 2 |
| Acuoso | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 2 | 3 | 0 |
| Acuoso | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 1 | 0 |
| Acuoso | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 2 | 3 |
| Acuoso | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 3 | 3 | 0 |
| Acuoso | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 1 | 6,67 |
| Acuoso | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 2 | 6,67 |
| Acuoso | 75% | <i>Meloidogyne sp.</i> | 4 | 3 | 6,67 |

Extractos 1= Etanólico, 2=Acuoso

Concentraciones 1=12%,2=25%,3=50%,4=75%

Nematodos 1= *Passalurus sp.* 2=*Meloidogyne sp.*

Tiempo 1=10min, 2=20min, 3=30min, 4=1hora

ANEXO O. Espectro infrarrojo del extracto acuoso del *Pleurotus ostreatus*

