

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN VEGETAL**



**“CONTROL DE *Meloidogyne sp.*, EN VIVEROS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.),
MEDIANTE EL HONGO *Paecilomyces lilacinus*”.**

POR:

IVONNE GUADALUPE LÓPEZ LINARES

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERA AGRÓNOMO

CIUDAD UNIVERSITARIA, DICIEMBRE DE 2009.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

ING. AGR. M.Sc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL:

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO:

DR. REINALDO ADALBERTO LÓPEZ LANDAVERDE

SECRETARIO:

ING. AGR. M.Sc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO.

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN VEGETAL:

ING. AGR. M.Sc. RAFAEL ANTONIO MENJIVAR ROSA

DOCENTES DIRECTORES:

ING. AGR. DR. ADAN HERNÁNDEZ

ING. AGR. M.Sc. ANDRÉS WILFREDO RIVAS FLORES.

RESUMEN

El trabajo se realizó en el invernadero de la Fundación Salvadoreña para la Investigación del café (PROCAFE), Avenida Manuel Gallardo, Santa Tecla. El objetivo fue conocer los efectos de la aplicación del hongo *Paecilomyces lilacinus* para el control de *Meloidogyne sp* en plantas de cafeto en etapa de vivero. Se hicieron dos investigaciones: En la primera se colectó suelo, se le hizo conteo de nemátodos y se instalaron dos ensayos separados:

A) POST-SIEMBRA: Se montó el ensayo con un diseño completamente al azar con 6 tratamientos y 9 repeticiones, se llenaron bolsas plásticas con el suelo, se sembraron las plántulas de cafeto en estado de concha y posteriormente se aplicaron los tratamientos siguientes: T1= 0.24gr de PAZAM (*P. lilacinus*)/ 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa. T2= 0.3 gr. de PAZAM (*P. lilacinus*) / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa. T3= 0.4 gr. de PAZAM (*P. lilacinus*)/ 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa. T4= 0.6 gr. de PAZAM (*P.lilacinus*) / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa. T5= Testigo Absoluto. Agua 450 ml aplicando 50ml / bolsa. T6 =Testigo Relativo Vydate L, (0.4ml del nematicida / bolsa / 9 bolsas = 3.6 ml de Vydate L (diluido en 450 ml de agua), aplicando 50 ml / bolsa. B) PRESIEMBRA: los tratamientos fueron aplicados 15 días antes de la siembra de las plántulas de cafeto en estado de concha.

En ambos ensayos, a los 120 días se presentó una muerte repentina de plantas. Se colectaron muestras de raíces y colocaron en medio de cultivo PDA y se determinó que la muerte se debía a la presencia de una especie de *Fusarium*. Debido a lo anterior se realizó control de calidad del producto PAZAM (*P. lilacinus*), para ello, se utilizó una pequeña cantidad del producto, que fue disuelto en agua destilada estéril y posteriormente se colocaron pequeñas gotas de la dilución dentro de las cajas conteniendo PDA, varios días después se observó el crecimiento del micelio del hongo sin presencia de contaminación, el cual mostró diferentes tonalidades durante su desarrollo, iniciando con una coloración blanca, luego una grisácea y casi al final un rosado pálido que en un mes y medio, a temperatura ambiente se tornó aun morado lila bastante oscuro.

Posteriormente se repitió el estudio y se instalaron nuevamente los 2 ensayos. En este caso se utilizó suelo con raíces de cafetos con síntoma de agallamiento, causado por nematodos del género *Meloidogyne* y se aplicaron los mismos tratamientos. Los resultados demostraron que no en todos los parámetros evaluados se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos a excepción de los parámetros número de masas de huevos de *Meloidogyne* por planta y el de número de nematodos en 100 gramos de suelo. Además se efectuó una prueba de parasitismo de *P. lilacinus* sobre *Meloidogyne sp.* que consistió en coleccionar individualmente masas de huevos del nematodo e introducir las dentro de pequeños tamices de 2cm de diámetro para posteriormente colocarlos dentro de cajas Petri plásticas de 5cm de diámetro conteniendo una suspensión de esporas del hongo. Se hicieron observaciones diarias sobre el número de larvas eclosionadas y se determinó que a partir del noveno día de exposición, el número promedio de larvas en los testigos fue de 32.87 y en las expuestas a la suspensión del hongo fue de 5.25, para un porcentaje de control del 84%. A los 13 días en las expuestas a los testigos fue de 83.87 y 4.75 en las expuestas a la suspensión del hongo, para un porcentaje de control del 44% respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODO PODEROSO

Por darme la fuerza y perseverancia durante toda mi carrera.

A LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Por la formación académica durante todos los años de estudio.

A LOS ASESORES

Ing.Agr.M.Sc. Andrés Wilfredo Rivas Flores por su valioso apoyo durante el desarrollo de esta investigación y al Dr. Adán Hernández por la oportunidad que me dio para realizar mi tesis bajo su apoyo, comprensión, paciencia y amistad.

A la Fundación PROCAFE, por permitirme realizar mi tesis en sus instalaciones y por brindarme todo el apoyo que fue muy necesario para poder realizarla, al personal que ahí labora quienes me brindaron su apoyo y amistad durante todo ese tiempo.

Al Ing.Agr. Leopoldo Serrano Cervantes y el Ing.Agr.M.Sc.Orlando Cáceres Rivera por facilitarme amablemente el producto PAZAM para la realización de la investigación.

DEDICATORIA

A DIOS:

Por darme la fuerza, sabiduría y por ser el guía de mí camino.

A MIS ABUELOS (Q.D.D.G.):

Francisca Linares y Manuel López, por todo el amor que me dieron durante sus vidas.

A MI QUERIDA MAMA:

Gloria Linares, quien es lo más importante en mi vida, gracias por su amor incondicional.

A MIS HERMANOS:

Gloria y Ernesto, por todo lo que en la vida aun nos espera y a Roberto por formar parte especial de mi vida.

A MIS AMIGOS.

Por haberme brindado su amistad durante todos estos años, Rebeca, Serafín, Julio Grande, Ing.Agr.Ruano, Ing.Agr.Roldán, etc. Y a todos aquellos que con el correr de los años estuvieron junto a mi, muy especialmente a Paola aunque ya no estés, algún día nos vamos a volver a encontrar.

Ivonne Guadalupe López Linares.

INDICE GENERAL

CONTENIDO.	Página
AUTORIDADES.....	i
RESUMEN.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA.....	vi
INDICE GENERAL.....	vii
INDICE DE CUADROS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xii
INDICE DE ANEXOS.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 <i>Meloidogyne</i>	2
2.1.1 Clasificación taxonómica.....	2
2.1.2 Características.....	3
2.1.3 Biología y hábitos.....	3
2.1.4 Especies en café.....	5
2.1.5 Daños que causan en plantas de café.....	5
2.2. PROGRAMA MANEJO INTEGRADO DE NEMATODOS EN CAFÉ...5	
2.2.1 Control preventivo.....	6
2.2.2 Control con materia Orgánica o Enmiendas Orgánicas.....	6
2.2.3 Control con injertación.....	6
2.2.4 Control con plantas repelentes o antagonistas.....	7
2.3 CONTROL BIOLÓGICO NEMATODOS.....	8
2.3.1 Hongos atrapadores de nemátodos.....	9
2.3.2 Hongos endoparásitos.....	9
2.3.3 Hongos parásitos de huevos.....	10
2.3.4 Hongos productores de toxinas.....	11

2.4 <i>Paecilomyces lilacinus</i>	12
2.4.1 Biología.....	13
2.4.2 Ciclo de vida	13
2.4.3 Modo de acción.....	13
2.4.4 Efectividad en control de nemátodos.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	15
3.2 FASE DE CAMPO.....	15
3.2.1 Colección de suelo infestado	15
3.2.2 Instalación de experimentos.....	16
A) Presiembra.....	17
A1) Llenado de bolsas y colocación dentro de macetas.....	17
A2) Aplicación de los tratamientos.....	18
A3) Siembra de plántulas de café.....	19
B) Post siembra.....	19
B1) Llenado de bolsas, colocación dentro de macetas y siembra de plántulas de café.....	19
B2) Aplicación de los tratamientos.....	20
3.3 METODOLOGIA ESTADISTICA.....	21
3.3.1 Diseño experimental.....	21
3.3.2 Modelo estadístico.....	21
3.3.3 Factores en estudio	22
3.3.4 Análisis estadístico.....	22
3.4 EVALUACIÓN DE DAÑOS EN EL PRIMER EXPERIMENTO.....	23
3.4.1 Aislamiento de hongo de plántulas enfermas en PDA.....	23
3.5 MONTAJE DE UN NUEVO EXPERIMENTO CON LOS MISMOS TRATAMIENTOS, NUMERO DE REPETICIONES Y DISTRIBUCIÓN.....	25
A) Presiembra.....	25
A1) Llenado de macetas	25
A2) Aplicación de los tratamientos.....	25
A3) Siembra de plántulas de café.....	26

B) Post siembra.....	27
B1) Llenado de macetas	27
B2) Siembra de plántulas de cafeto.....	27
B3) Aplicación de los tratamientos.....	27
3.6 FASE DE LABORATORIO.....	29
3.6.1 Procesamiento de los diferentes parámetros evaluados.....	29
3.6.2 Altura de plantas	29
3.6.3 Peso de raíces y parte aérea	30
3.6.4 Evaluación de daños en las raíces de acuerdo a una escala.....	31
3.6.5 Control de calidad del producto PAZAM (<i>P.lilacinus</i>).....	32
3.6.6 Prueba de parasitismo de <i>Paecilomyces lilacinus</i> sobre <i>Meloidogyne sp</i>	33
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
5. CONCLUSIONES.....	40
6. RECOMENDACIONES.....	41
7. BIBLIOGRAFIA.....	42
8. ANEXOS.....	45

INDICE DE CUADROS

Contenido	Página
Cuadro 1. Distribución estadística del diseño completamente al azar.....	21
Cuadro A-1 Plano de campo para E-1 y E-2	46
Cuadro A-2 Programa de fertilización de plántulas de cafeto.....	50
Cuadro A-3 Formato de control de datos.....	51
Cuadro A-4 Alturas de plantas 180 días después de siembra.....	56
Cuadro A-5 Análisis de varianza para la variable altura de plantas.....	56
Cuadro A-6 Peso total.....	57
Cuadro A-7 Análisis de varianza para la variable peso total.....	57
Cuadro A-8 Peso de parte aérea	58
Cuadro A-9 Análisis de varianza para la variable peso de parte aérea.....	58
Cuadro A-10 Peso de raíces	59
Cuadro A-11 Análisis de varianza para la variable peso de raíces.....	59
Cuadro A-12 Número de masas de huevos de <i>Meloidogyne</i> por planta.....	60

Cuadro A-13 Datos transformados de número de masas de huevos de <i>Meloidogyne</i> por planta.....	60
Cuadro A-14 Análisis de varianza para la variable número de masas de Huevos de <i>Meloidogyne</i> por planta.....	60
Cuadro A-15 Número de nemátodos en 100gr.de suelo.....	61
Cuadro A-16 Datos transformados de número de nemátodos en 100gr.de suelo...	62
Cuadro A-17 Análisis de varianza para la variable número de nemátodos en 100 gr. de suelo.....	62
Cuadro A-18 Número de larvas eclosionadas por repetición y por tratamiento...	63
Cuadro A-19 Primera toma de datos, del experimento “Prueba de parasitismo de <i>Paecilomyces lilacinus</i> sobre <i>Meloidogyne sp</i>	64
Cuadro A-20 Segunda toma de datos del experimento “Prueba de parasitismo de <i>Paecilomyces lilacinus</i> sobre <i>Meloidogyne sp</i> ”.....	64
Cuadro A-21 Tercera toma de datos del experimento “Prueba de parasitismo de <i>Paecilomyces lilacinus</i> sobre <i>Meloidogyne sp</i> ”.....	65
Cuadro A-22 Cuarta toma de datos del experimento “Prueba de parasitismo de <i>Paecilomyces lilacinus</i> sobre <i>Meloidogyne sp</i> .”.....	66

Contenido	INDICE DE FIGURAS	Página
Figura 3. Nemátodo parasitado por el hongo <i>Arthrobotrys</i>		9
Figura 4. Nemátodo infectado por el hongo <i>Drechmeria coniospora</i>		10
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Meloidogyne sp</i>		3
Figura 2. Nemátodo atrapado por el hongo <i>Monacrosporium</i>		9
Figura 5. Nemátodo parasitado por el hongo <i>Harposporium spp</i>		10
Figura 6. Huevo de nematodo parasitado por el hongo <i>Verticillium spp</i>		10
Figura 7. Hifas de <i>Paecilomyces lilacinus</i> parasitando huevos de <i>Meloidogyne sp</i>		10
Figura 8. Hembra nematodo del género <i>Meloidogyne sp.</i> , con su masa de huevos infectado por el hongo <i>Paecilomyces lilacinus</i>		11
Figura 9. Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> en su hábitat natural.....		11
Figura 10. Colonias de <i>Paecilomyces lilacinus</i> en cajas Petri, conteniendo PDA (Papa-Destroxa-Agar).....		12
Figura 11. Sultana (<i>Impatiens spp.</i>).....		15
Figuras 12. Recolección de suelo en cafetal.....		16
Figuras 13 y 14. Desinfección de mesa y colocación de plástico.....		16

Figuras 15 y 16. Llenado de bolsas y colocación dentro de macetas.....	17
Figuras 17 y 18. Aplicación de tratamientos.....	18
Figuras 19 y 20. Siembra de plántulas de café en estado de concha.....	19
Figura 21. Aplicación de tratamientos en experimento post siembra.....	20
Figuras 22 y 23. Plantas de café de los dos experimentos con síntomas de Marchitez.....	23
Figuras 24. Aislamiento de raíces de café enfermas en PDA.....	23
Figuras 25. Últimas plantas enfermas de los experimentos.....	24
Figuras 26 y 27. Observación y elección en vivero de plantas de café a utilizar.....	24
Figuras 28. Obtención del suelo.....	25
Figuras 29. Llenado de macetas.....	25
Figura 30. Aplicación de tratamientos en pre siembra.....	26
Figura 31. Aplicación de tratamientos en post siembra.....	28
Figura 32. Plantas de café enfermas.....	28
Figuras 33 y 34. Medición de alturas en las plantas de café.....	29
Figuras 35 y 36. Preparación de plantas para medición.....	30
Figuras 37. Pesos de las diferentes partes de las plantas.....	30

Figuras 38 y 39. Observación al microscopio estereoscopio de una raíz de café con presencia de masas de huevo del nematodo <i>Meloidogyne sp.</i>	31
Figuras 40 y 41. Aislamiento de <i>Paecilomyces lilacinus</i> a partir de producto PAZAM en PDA.....	33
Figuras 42 y 43. Preparación de la suspensión de esporas de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	34
Figuras 44 y 45. Pequeñas cajas petri plásticas, conteniendo los tamices con las Masas de huevos de <i>Meloidogyne sp.</i> y la suspensión de esporas de <i>P.lilacinus</i>	34
Figuras 46 y 47. Masa de huevos y nemátodos eclosionados de <i>Meloidogyne sp.</i> Observados al microscopio estereoscopio durante la prueba.....	34
Figuras A-1 y A-2. Distribución de macetas según plano de campo.....	46
Figura A-3. Producto PAZAM.....	47
Figura A-4. Preparación de la suspensión del hongo <i>Paecilomyces lilacinus</i>	48
Figuras A-5. Preparación de la dilución del nematocida –insecticida Vydate L.....	49
Figura A-6. Fertilización de plántulas de café.....	50
Figura A-7. Riego con agua, aplicación de 100 ml/planta.....	50
Figuras A-8. Procedimiento de extracción de nemátodos.....	52
Figura A-9. Lavado de la muestra de suelo para luego filtrarla en los tamices.....	52
Figura A-10. Tamices utilizados.....	53
Figuras A-11. Procedimiento de tamizado de la muestra.....	53

Figuras A-12. Procedimiento para centrifugar la muestra.....	54
Figuras A-13. Procedimiento de la segunda centrifugación de la muestra.....	54
Figura A-14. Decantación de la muestra sobre tamiz.....	55
Figuras A-15. Lavado, tamizado y observación de muestra obtenida.....	55
Figura A-16. Altura de plantas 180 días después de siembra.....	56
Figura A-17. Peso total (gr.).....	57
Figura A-18. Peso de parte aérea (gr.).....	58
Figura A-19. Peso de raíces (gr.).....	59
Figura A-20. Número de masas de huevos de <i>Meloidogyne</i> por planta.....	61
Figura A-21. Número de nemátodos en 100 gr. de suelo.....	62
Figura A-22. Resultado de la prueba de parasitismo de <i>P.lilacinus</i> sobre <i>Meloidogyne sp.</i>	66
Figura A-23. Crecimiento de colonias del hongo <i>P.lilacinus</i>	67
Figuras A-24. Conidioforos, fialidas y conidios, estructuras del hongo <i>P.lilacinus</i> observadas al microscopio.....	67

INDICE DE ANEXOS

Contenido	Página
A -1. Preparación y aplicación de los tratamientos.....	47
A-2. Manejo agronómico de los experimentos.....	50
A-3. Determinación de la población final de nemátodos en el suelo Durante el estudio (método centrifugación-flotación en azúcar).....	52
A-4. Control de calidad del producto PAZAM (<i>P.lilacinus</i>).....	67

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas de café en vivero, como en cafetales establecidos son afectados por nemátodos fitoparásitos; estos organismos son microscópicos, y atacan las raíces de los cafetos que parasitan. Los nemátodos que atacan el cultivo del café pertenecen a dos géneros: *Pratylenchus* que son conocidos como lesionadores y *Meloidogyne* que se caracterizan por desarrollar agallas sobre las raíces. Poblaciones de estos dos géneros pueden ser encontrados en el mismo terreno o en muchos casos solamente uno de ellos (Hernández y Rivera, 2001).

En vivero causan las siguientes pérdidas económicas: Destrucción de plantas debido a muerte de la planta y la pérdida del valor económico de esta, ya que una planta con apariencia enferma o débil no es comercializable, además del incremento de los costos de producción debido a la aplicación de nematicidas para su control. (Sandoval y Escobar, 2002).

La producción de plantas en vivero libres de nemátodos ayuda a incrementar la producción de la plantación y además, evita infestación y proliferación de nemátodos en terrenos libres de esta plaga. Sin embargo para obtener plantas de buena calidad, es necesario realizar un programa de control de nemátodos en esta etapa, en lugares donde se detecta su presencia. El método tradicional de control ha sido la desinfección del suelo mediante el uso de productos químicos fumigantes y/o nematicidas aplicados después del trasplante de la concha. El uso de estos productos ha causado problemas de intoxicación en las personas que los aplican y aumento en los costos de producción. Por la situación anteriormente mencionada en el presente trabajo se proyectaron la siguiente hipótesis y objetivos: La aplicación del hongo *Paecilomyces lilacinus*, al sustrato utilizado para plantas de café en etapa de vivero, reduce la población y el daño ocasionados por nemátodos fitoparásitos de la raíz. Objetivo General: Conocer los efectos de la aplicación del hongo *Paecilomyces lilacinus* para el control de *Meloidogyne* y/o *Pratylenchus* en cafetos en etapa de vivero. Como objetivos específicos: Determinar la dosis del hongo que hay que aplicar en el sustrato de las plantas de café para control de nemátodos fitoparásitos y Evaluar los efectos de la aplicación de *Paecilomyces lilacinus* Sobre poblaciones de nemátodos fitoparásitos.

2. MARCO TEÓRICO

Muchos géneros y especies de nemátodos están asociados al café en diferentes países del mundo, incluidos los nemátodos más dañinos que causan grandes pérdidas a los productores de café y a la economía local de los países en vías de desarrollo (Campos, Sivapalan y Gnanapragasam, 1990).

Los nemátodos pueden producir síntomas característicos según la especie, en el sistema radicular de las plantas tales como agallas, lesiones necróticas en las raíces, proliferación de raíces secundarias y pobre crecimiento radicular, lo que se traduce en clorosis y en general plantas débiles con pobre crecimiento (Talavera, 2003).

Entre los nemátodos de mayor importancia económica en plantaciones de cafetos, se encuentran los del género *Meloidogyne* (Giraldo, et al., 1998).

2.1. *Meloidogyne*.

Se caracterizan porque desarrollan agallas de distintos tamaños sobre las raíces que parasitan (Infoagro, 2008).

2.1.1. Clasificación taxonómica.

Según Agrios (2001), la clasificación taxonómica de los nemátodos del género *Meloidogyne* es la siguiente:

PHYLUM: *Nematoda*

ORDEN: *Tylenchida*

SUBORDEN: *Tylenchina*

SUPERFAMILIA: *Hetero deroidea*

FAMILIA: *Heteroderidae*

GENERO: *Meloidogyne*

2.1.2 Características.

Los nemátodos adultos macho y hembra del genero *Meloidogyne* son fácilmente identificables morfológicamente, ya que los machos tienen forma vermiforme y miden aproximadamente de 1.2 a 1.5 mm de largo por 0.30 a 0.36 mm de ancho. Las hembras tienen forma de pera y un tamaño aproximado de 0.40 a 1.30 mm de largo por un ancho de 0.27 a 0.75mm (Agrios, 2001).

2.1.3 Biología y hábitos.

El ciclo de vida de estos nemátodos comprende 4 estadios larvarios y un estadio adulto (Hernández y Rivera, 2001), (Figura 1).

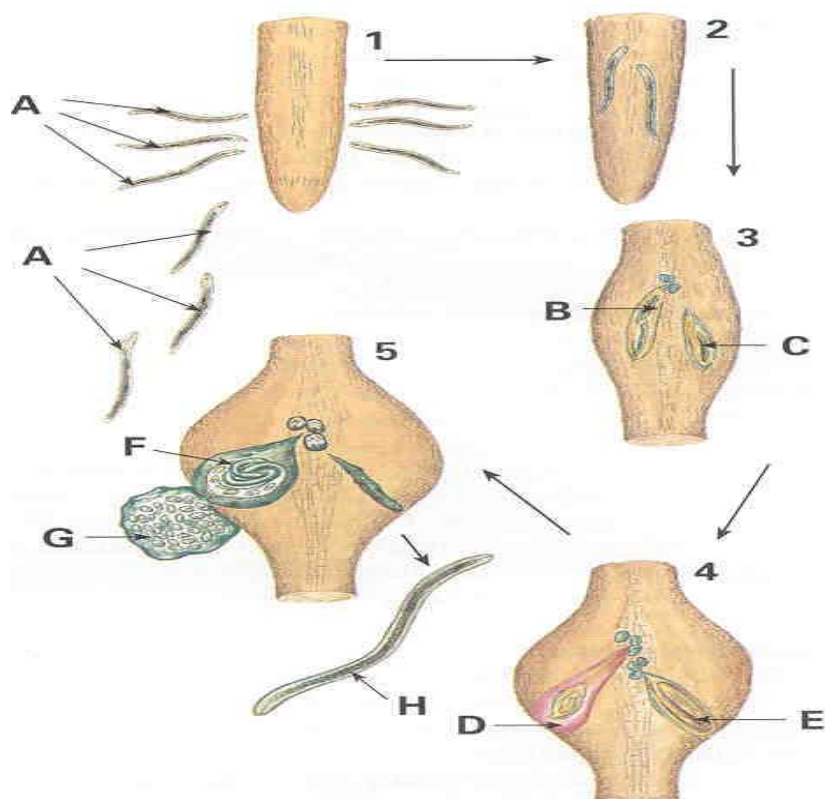


Fig. 1. Ciclo de vida de *Meloidogyne* sp. 1) Larvas entrando a la raíz, 2) Larvas fijadas en la raíz, 3) Inicio de formación de agallas, 4) Agalla con macho y hembra en formación, 5) Agalla y hembra con masa de huevos; A) Larvas, B) Hembra en formación, C) Macho en formación, D) Hembra joven, E) Macho joven, F) Hembra adulta, G) Masa de huevos, H) Macho adulto.

Agrios (2001), describe la biología de los nemátodos del género *Meloidogyne*, de la siguiente manera: La hembra que está en el interior de la raíz, deposita aproximadamente 500 huevecillos en una sustancia gelatinosa que ella misma produce. La primera etapa larvaria se desarrolla en el interior del huevecillo y después de sufrir la primera muda dentro de él se desarrolla en la segunda etapa larvaria, de esta última forma emerge del huevecillo y llega al suelo, donde se desplaza hasta que encuentra una raíz susceptible. En la segunda etapa larvaria es vermiforme y es la única etapa infectiva de este nemátodo, en el caso de que un hospedante susceptible se encuentre en sus alrededores, la larva penetra a la raíz, se vuelve sedentaria y aumenta de grosor, tomando la forma de una salchicha. El nemátodo se alimenta de las células que se encuentran en torno a su cabeza al insertar su estilete y secretar saliva en ellas. La saliva estimula a las células para que crezcan y también licua parte de su contenido, el cual succiona a través de su estilete. El nemátodo sufre una segunda muda y da lugar a la tercera etapa larvaria, la cual es similar a la segunda etapa larvaria en donde se diferencia por carecer del estilete y ser más gruesa. La tercera etapa larvaria sufre una tercera muda y se desarrolla en la cuarta etapa larvaria, en la cual es posible distinguirlo ya como un individuo macho o hembra. El macho de la cuarta etapa larvaria tiene aspecto vermiforme y se enrolla dentro de la tercera cutícula. Sufre la cuarta y última muda y emerge de la raíz ya como macho adulto; el cual vive libremente en el suelo. La hembra de la cuarta etapa larvaria continúa aumentando de grosor y en un poco más de longitud, sufre la cuarta y última muda y se desarrolla en una hembra adulta, la cual tiene forma de pera. La hembra adulta continúa hinchándose, ya sea fecundada o no por un macho, debido a que la reproducción se efectúa por medio de huevecillos y puede ser sexual, hermafrodita o partenogenética. Los huevecillos pueden ser depositados dentro o fuera de los tejidos de la raíz, dependiendo de la posición que tenga la hembra. El ciclo de vida del nemátodo concluye a los 25 días a una temperatura de 27°C, pero tarda más tiempo a temperaturas más altas o más bajas.

2.1.4 Especies en café.

Las especies del género *Meloidogyne* más comúnmente encontradas en cafetos son:

- *Meloidogyne exigua*
- *Meloidogyne incógnita*
- *Meloidogyne coffeicola*
- *Meloidogyne javanica*

(Sandoval y Escobar, 2002).

2.1.5 Daños que causan en plantas de café.

Los nemátodos formadores de los nódulos de la raíz dañan a las plantas al debilitar las puntas de la raíz o al inhibir su desarrollo, pero principalmente al inducir la formación de hinchamientos en las raíces, los cuales perjudican a la planta en la absorción de sus nutrientes (Agrios, 2001).

Debido a los daños que ocasionan sobre las raíces, las plantas de vivero pierden vigor y presentan las hojas de color amarillento, como faltas de fertilización. En plantaciones comerciales, los cafetos se observan agotados, botan las hojas y finalmente mueren (Hernández y Rivera, 2001).

2.2 PROGRAMA MANEJO INTEGRADO DE NEMÁTODOS EN CAFE.

El programa de manejo integrado de nemátodos parásitos de cafetos comprende la aplicación de prácticas preventivas, uso de materiales orgánicos, injertación, uso de plantas repelentes y control biológico (Vásquez, 1996).

La forma más común de diseminación de los nemátodos de un sitio a otro es por medio del transporte de suelo y plantas infestadas. El objetivo de las medidas preventivas es evitar la entrada de nemátodos fitoparásitos de lugares infestados a lugares libres de la plaga (Hernández y Rivera, 2001).

2.2.2 Control con materia orgánica o enmiendas orgánicas.

La adición de materia orgánica al suelo para mejorar la fertilidad y controlar las plagas y enfermedades es casi tan antigua como la agricultura. Una enmienda orgánica es cualquier material de origen orgánico que se añade al suelo. Entre estos materiales se pueden incluir las compostas, los residuos de cosechas anteriores, estiércol animal, desperdicios agroindustriales y municipales, entre otros (Chavarría-Carvajal, 1997).

La aplicación de material orgánico como enmienda, afecta directa o indirectamente las poblaciones y la diversidad de nemátodos en el suelo. De forma directa, este material, libera compuestos nematicidas en su descomposición o que son sintetizados por microorganismos envueltos en su descomposición, y proveen un ambiente favorable para el crecimiento de microorganismos antagónicos o parasíticos a los fitonemátodos. De manera indirecta, puede incrementar el desarrollo y rendimiento de una planta infestada con nemátodos, mejora la estructura del suelo, que a su vez aumenta su potencial de retención de agua y suple nutrimentos en los suelos deficientes (Brown, 1987; Chavarría-Carvajal y Rodríguez-Kábana, 1998; Widmer et al. 2002).

2.2.3 Control con injertación.

La práctica de injertación, como método de combate de nemátodos, consiste en injertar variedades comerciales sobre un patrón de *Coffea canephora* (Robusta), resistente a nemátodos. Estos microorganismos no afectan las raíces de los porta injertos y las variedades injertadas producen con todo su potencial. Sin embargo no todos los Robusta son resistentes a nemátodos, por esta razón se debe utilizar variedades porta injerto como Quillou, Apoata y Laurentii que se ha comprobado son resistentes a nemátodos. En El Salvador se ha seleccionado y mejorado una nueva variedad porta injerto denominada “Nemaya”, altamente resistente a los nemátodos *Meloidogyne* y *Pratylenchus* (Hernández y Rivera, 2001).

Se ha encontrado que ciertas especies vegetales han desarrollado un amplio rango de elementos defensivos para protegerse, ya sea porque contienen o exudan compuestos con acción nematocida porque son compuestos biocidas; ya que alteran su comportamiento o desarrollo; interrumpen las mudas, eclosión u otros procesos controlados hormonalmente. Los compuestos de estas plantas además pueden interferir en la localización del hospedero, reconocimiento, alimentación y actividad reproductiva. Estos componentes pueden tener más de un modo de acción, los que interactúan interfiriendo en el desarrollo del nemátodo. Pueden tener efectos indirectos sobre la planta hospedera, ya sea estimulando el crecimiento de la planta, aumentando la tolerancia al ataque o también aumentando la reacción de defensa en el hospedero. Entre las plantas antagonicas más estudiadas en los sistemas de cultivo están especies de *Tagetes* y otras asteraceas, por ejemplo: *Helenium spp.*, *Cosmos spp.*, *Gaillardia spp.*, *Calendula officinalis*, *Zinnia elegans*, entre otras. Numerosos experimentos han mostrado que varias especies y cultivares de *Tagetes* pueden controlar eficientemente nemátodos en cultivos establecidos, ya sea cuando se usan como rotación, en cultivos de cobertura o como enmienda al suelo; además varios compuestos nematocidas han sido obtenidos de esta especie. También se han estudiado algunas brassicaceas como *Brassica rapa*, *Ricinus comunis*, *Asparagus officinalis*, *Sesamun oriental*, y algunas fabaceas como *Crotalaria spp.*, *Stizolobium deernigianum*, *Cassia fasciculata*, las cuales poseen un efecto nematocida y no son buenos hospederos de nemátodos fitoparasitos, por lo cual pueden ser utilizadas en rotaciones, abonos verdes, cultivos intercalados o de cobertura, o como enmiendas (Aballay, 2005).

Las leguminosas de cobertura son consideradas plantas que poseen una mayor variedad de fitotoxinas que cualquier otra familia (Villain et al., 1999). Esta fitotoxinas se concentran en hojas, vainas, semillas y raíces (Domínguez et al., 1990). Las leguminosas más utilizadas para el control de nemátodos son: *Pueraria phaseoloides*, *Arachis pintoii*, *Centrosema acutifolium*, *C. macrocarpum* y *Stizolobium spp.* Estas especies han reducido significativamente el índice de agallamiento en los trabajos realizados con nemátodos agalladores (Domínguez, et al., 1990; Herrera, 1997; Herrera y Marban, 1999).

2.3 CONTROL BIOLÓGICO DE NEMATODOS.

8

El control biológico de nemátodos formadores de agallas abarca una gran diversidad de organismos que viven en el suelo, conocidos como enemigos naturales de los nemátodos que atacan a las plantas. Entre ellos se destacan *Bacillus (Pasteuria) penetrans*, que es un parásito obligado de algunos nemátodos fitoparásitos (Agrios, 2001). El hongo *Arthrobotrys oligospora* a partir del cual se descubrió por primera vez que un hongo era capaz de infectar nematodos; *Monacrosporium spp.* el cual es un hongo parásito facultativo; en el caso de *Catenaria anguillulae*, *Drechmeria coniospora* o *Hirsutella rhossiliensis* son hongos parásitos obligados de nemátodos; además se conocen hongos que actúan en suelos que naturalmente son supresivos para los nemátodos entre estos se encuentran *Verticillium chlamyosporium* y *Dactylella oviparasitica*. También es importante mencionar al hongo descomponedor de madera *Pleurotus ostreatus* que forma toxinas en las estructuras de sus hifas para inmovilizar a los nemátodos antes de infectarlos. Por último se puede hablar de uno de los hongos más ampliamente probados para el control de nemátodos *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, a este hongo se le atribuye la facultad de parasitar huevos y hembras de nematodos (Waingwright, 1995).

Los hongos nematófagos son microorganismos con la capacidad de atacar, matar y digerir nemátodos (adultos, juveniles y huevos). Aparte de su habilidad nematófaga muchos de estos hongos pueden también vivir saprofiticamente en materia orgánica muerta, atacar a otros hongos (micoparásitos) y colonizar raíces de plantas como endófitos. Hay más de 300 especies de hongos nematófagos descritos, encontrados por todo el mundo, incluyendo las regiones polares. Los hongos son habitantes del suelo, generalmente más frecuentes en suelos con elevado contenido en materia orgánica (Nordbring-Hertz, et al, 1995).

Los hongos nematófagos se dividen en cuatro grupos dependiendo de su modo de infectar nemátodos. El resultado de la infección es un nemátodo completamente digerido. Los nutrientes provenientes de los nemátodos son utilizados para formar nuevas estructuras fúngicas (hifas, esporas, etc.) (Jansson y López-Llorca, 2001).

2.3.1 Hongos atrapadores de nemátodos.

Son hongos que capturan a los nemátodos mediante estructuras especializadas como anillos constrictivos o no constrictivos, protuberancias adhesivas y finalmente produciendo un material adhesivo a lo largo de toda la superficie del micelio. El hongo penetra la cutícula del nemátodo por la trampa formando el bulbo de infección dentro del nemátodo, a partir del cual las hifas tróficas crecen dentro del cuerpo y digieren sus contenidos. Géneros comunes de hongos atrapadores de nemátodos son *Arthrobotrys* (Fig.3) y *Monacrosporium* (Fig.2) (Jansson y López-Llorca, 2001).



Fig 2. Nemátodo atrapado por el hongo *Monacrosporium*. (Jansson y López-Llorca, 2001).

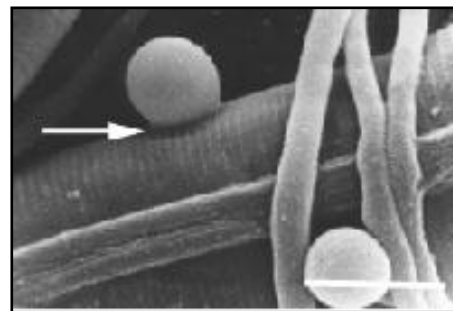


Fig 3. Nemátodo parasitado por el hongo *Arthrobotrys*. (Jansson y López-Llorca, 2001).

2.3.2 Hongos Endoparásitos.

Los endoparásitos son hongos que utilizan sus esporas para infectar nemátodos. Estos hongos son a menudo parásitos obligados de nemátodos, y fuera del cuerpo infectado del nemátodo aparecen sólo como estructuras de diseminación. Las esporas de estos hongos pueden ser zoosporas móviles (como las de *Catenaria spp.*) que se enquistan sobre el nemátodo adhiriéndose a él y penetrando la cutícula, conidios adhesivos (por ejemplo en *Drechmeria coniospora*) (Fig.4) o conidios que son ingeridos (*Harposporium spp.*) por los nemátodos bacteriófagos (Fig.5), (Jansson y López-Llorca, 2001).



Fig 4. Nemátodo infectado por el hongo *Drechmeria coniospora*. (Jansson y López-Llorca, 2001).

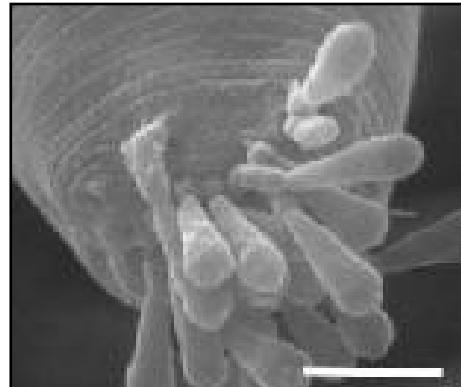


Fig 5. Nemátodo parasitado por el hongo *Harposporium* spp. (Jansson y López-Llorca, 2001).

2.3.3 Hongos parásitos de huevos.

Estos hongos infectan estadios no móviles (huevos) de nemátodos. Producen apresorios (estructuras de infección en los extremos de las hifas que se adhieren a la cubierta del huevo). La cubierta del huevo es penetrada por el hongo y el contenido es digerido. Los géneros más comunes de este grupo son *Verticillium* spp. (Fig.6) Y *Paecilomyces lilacinus* (Figs. 7 y 8), (Jansson y López-Llorca, 2001).



Fig 6. Huevo de nemátodo parasitado por el hongo *Verticillium* spp. (Jansson y López-Llorca, 2001).

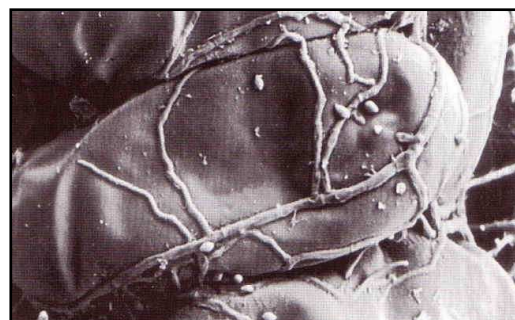


Fig 7. Hifas de *Paecilomyces lilacinus* parasitando huevos de *Meloidogyne* sp. (Jansson y López-Llorca, 2001).

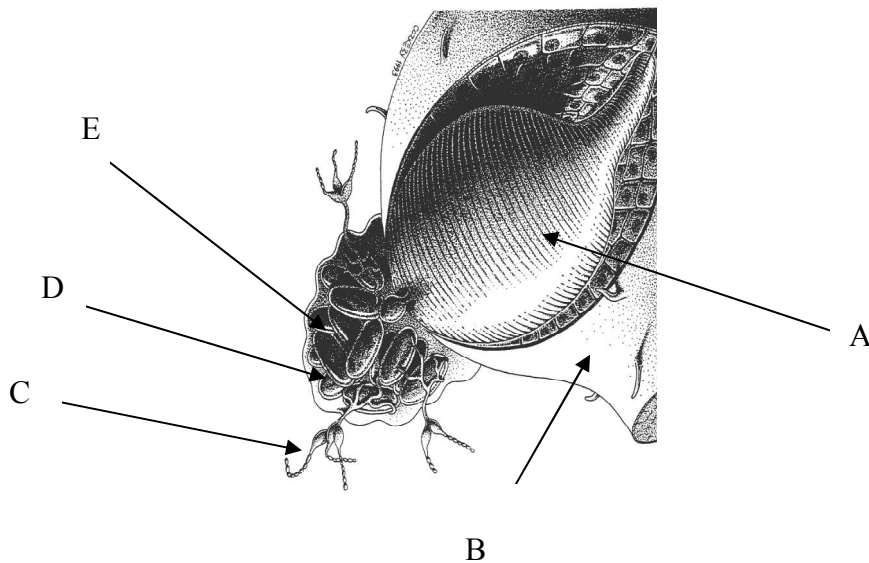


Fig.8 Hembra nemátodo del género *Meloidogyne* sp., con su masa de huevos, infectada por *Paecilomyces lilacinus*. A) Hembra de *Meloidogyne*, B) Agalla en raíz, C) Conidios de *P. lilacinus*, D) Huevos colonizados por *P. lilacinus*, E) Masa de huevos (Esser, 1993).

2.3.4 Hongos productores de toxinas.

El hongo más común de este grupo es el descomponedor de madera *Pleurotus ostreatus* (hongo ostra) y otros *Pleurotus spp.* Las hifas de estos hongos son "tallos" cortos que contienen una gota de toxina. Tras ponerse en contacto con la toxina, el nemátodo es rápidamente inmovilizado y las hifas del hongo crecen quimiotrópicamente (dirigidas) a través de la boca del nemátodo, que como en el caso de los anteriores hongos nematófagos, es digerido (Jansson y López-Llorca, 2001).



Fig 9. Hongo *Pleurotus ostreatus* en su hábitat natural. (Jansson y López-Llorca, 2001).

2.4 *Paecilomyces lilacinus*.

P. lilacinus es un hongo saprófago, filamentoso común. Se ha aislado de una amplia gama de hábitat incluyendo suelos cultivados y no cultivados (bosques, prados, desiertos), los sedimentos y el lodo de aguas residuales. También se ha encontrado en huevos de nemátodo, y en ocasiones en hembras de nemátodos. Además, se ha detectado con frecuencia en la rizósfera de muchos cultivos. La especie puede crecer en una amplia gama de temperaturas desde 8°C a 38°C para algunos aislados, con crecimiento óptimo en el rango de 26°C a 30°C. También tiene una tolerancia amplia del PH y puede crecer en una variedad de sustratos (Samson, 1974).

P. lilacinus ha demostrado resultados prometedores para el uso como agente de biocontrol para controlar el crecimiento de los nemátodos que destruyen las raíces (Anderson, Domsch, y Gams.1995).

El género *Paecilomyces* fue descrito por Bainier en 1907 y su clasificación taxonómica es:

Reino: *Fungi*

Phylum: *Ascomycota*

Clase: *Ascomycetes*

Orden: *Eurotiales*

Familia: *Trichocomaceae*

Género: *Paecilomyces*

Especie: *Lilacinus*

(Wikipedia, 2008)



Fig 10. Colonias de *Paecilomyces lilacinus* en cajas Petri, conteniendo PDA (Papa-Destroxa-Agar).

2.4.1 Biología.

P. lilacinus forma un micelio denso que da lugar a conidioforos, estos llevan filamentos en los extremos cuyas esporas se forman en cadenas largas. Las esporas germinan cuando la humedad y los alimentos convenientes están disponibles. Las colonias en agar de malta crecen rápido, logrando un diámetro de 5-7 cm en 14 días a 25°C, consistiendo en un fieltro básico con un crecimiento excesivo velludo del micelio aéreo; primero es blanco pero cuando esporula cambia a varias coloraciones vinosas. El reverso es a veces incoloro pero generalmente en cortinas vinosas (Samson, 1974).

2.4.2 Ciclo de vida.

P. lilacinus es altamente adaptable en su estrategia de vida, dependiendo de la disponibilidad de alimentos en los microambientes circundantes puede ser: Entomopatogénico, Micoparasítico, Saprofítico, Nematofago (Santo-Pietro, 2008).

2.4.3 Modo de acción.

P. lilacinus infecta y asimila principalmente los huevos de *Meloidogyne spp.* Y los nemátodos del quiste (*Globodera spp.*, y *Heterodea spp.*). El hongo ha sido sujeto de considerables investigaciones de control biológico que siguen después de su descubrimiento como un agente de control biológico en 1979. Se ha considerado que tiene el potencial más grande para el uso como agente de biocontrol en suelos de agricultura tropical y subtropical. Tiene casi una distribución mundial, aunque más frecuentemente en climas calientes. Para su distribución, cultivos del hongo fueron enviadas a investigadores en 46 países a través del “Proyecto Internacional de *Meloidogyne*” (Stirling, 1990; Jatala 1986).

P. lilacinus es parásito de varias especies de nemátodos fitoparásitos. El hongo inicia su ataque cuando las conidias entran en contacto sobre el nemátodo; una vez que la conidia germina, esta produce enzimas que disuelven la cutícula haciendo un pequeño agujero a través del cual el hongo comienza a crecer en el cuerpo produciendo unas toxinas que matan el nemátodo. El hongo se reproduce formando millones de conidias que están en capacidad de infectar otros nemátodos (Jatala, 1985).

El hongo es capaz de penetrar huevos de nemátodos y se puede observar reducción de la eclosión, el aspecto de los huevos es de embriones contraídos, se observan también vacuolizaciones internas de las larvas del primer estadio, segmentación y gastrulación atípicas y en algunas ocasiones hifas de diferentes tamaños., crece dentro del mismo y destruyen el embrión (Cabanillas, Barker, y Daykin. 1988).

2.4.4 Efectividad en el control de nemátodos.

P. lilacinus parasita a huevos y hembras de nemátodos, causando deformaciones, destrucción de ovarios además produce toxinas que afecta el sistema nervioso de los nemátodos también se ve algunas veces sobre nemátodos en estados libres o móviles, o sobre hembras sedentarias. Las masas de huevos pueden ser reducidas o suprimidas a veces, la formación de agallas en los tejidos de la raíz de la planta huésped se inhibe (Cabanillas, Barker, y Daykin. 1988).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.

El estudio se realizó en las instalaciones (invernadero y laboratorio de Nematología) de la Fundación Salvadoreña para la Investigación del café (PROCAFE), ubicada en la Avenida Manuel Gallardo, frente a residencial Monte Sión, Santa Tecla. El lugar se encuentra ubicado en latitud 13° 40'59.9" N y longitud 89°17'14.8" W; con una elevación de 875 m.s.n.m. La duración del estudio fue de abril de 2008 a junio de 2009 y comprendió dos fases.

3.2 FASE DE CAMPO

3.2.1 Colección de suelo infestado.

Para esta actividad se planificó y realizó un viaje al municipio de Izalco, departamento de Sonsonate, específicamente al Cantón Cruz Grande, caserío San Diego, finca Santa Rosa, la cual esta ubicada a una elevación de 800 m.s.n.m, con una plantación de cafeto variedad "Pacas". Previo a la recolección del suelo se procedió a identificar la presencia de nemátodos en los huéspedes que permiten con mayor facilidad ser identificados, en este caso se trato de una planta conocida como sultana (*Impatiens spp.*), la cual es muy susceptible al ataque e invasión de nemátodos en sus raíces (Figura 11). Luego de la identificación de nodulaciones se procedió a la extracción de suelo directamente de la plantación de cafetos, el cual fue transportado hacia las instalaciones de PROCAFE, en Santa Tecla.

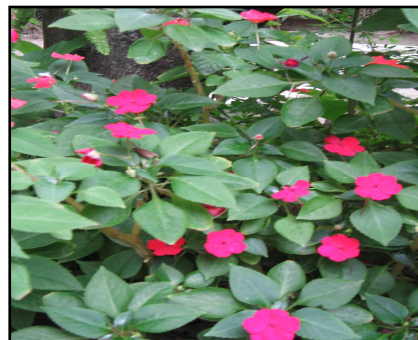


Fig 11. Sultana (*Impatiens spp.*).



Fig. 12. Recolección de suelo en cafetal.

A partir de la obtención del suelo en Izalco(Fig.12), se procedió a la determinación de la población inicial de nemátodos en 50gr de suelo por el método de incubación, el cual consiste en dejar en reposo 50gr de suelo envuelto en papel toalla y cubierto con una pequeña cantidad de agua, por dos días aproximadamente, lo cual permitió la migración de los nemátodos presentes en el suelo hacia el agua, posteriormente fue filtrada a través de un tamiz de 500 mesh para la posterior observación y determinación de la presencia de nemátodos en este caso *Meloidogyne sp.* Se identificaron 5 larvas por 50 gramos de suelo.

3.2.2 Instalación de experimentos.

Antes de la ubicación de los experimentos, se procedió a la limpieza y desinfección de dos mesas con lejía al 70%(Fig.13), y se colocó plástico en la base de estas (Fig.14), dejando un día de intermedio para la ubicación de las primeras macetas.



Fig. 13. Desinfección de mesa.



Fig.14. Colocación de plástico.

Se instalaron dos estudios:

A) Presiembra

Después del montaje del experimento, los tratamientos se aplicaron 15 días antes de la siembra de las plántulas en estado de concha.

A1) Llenado de bolsas y colocación dentro de macetas.

Se utilizaron bolsas de polietileno de 6 X 9 Pulg., las cuales fueron llenadas y colocadas dentro de macetas con dimensiones de 18 X 17 X15 Cm. limpias y amplias, con el objetivo de colocar las bolsas y mantenerlas en pie aisladas unas de otras. Las bolsas se regaron (3 veces /semana) con 200ml de agua (Figs.15 y 16).



Fig.15. Llenado de bolsas



Fig.16. Colocación dentro de macetas.

A2) Aplicación de los tratamientos.

Se aplicaron 6 tratamientos a las 9 repeticiones de cada uno de estos, quedando un total de 54 bolsas conteniendo suelo a las que se les aplico (Figs.17 y 18).

- T1= 0.24gr de PAZAM (*P. lilacinus*)/ 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T2= 0.3 gr. de PAZAM (*P. lilacinus*) / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T3= 0.4 gr. de PAZAM (*P. lilacinus*)/ 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T4= 0.6 gr. de PAZAM (*P.lilacinus*) / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T5= Testigo Absoluto Agua 450 ml aplicando 50ml / bolsa.
- T6 =Testigo Relativo Vydate L, (0.4ml del nematicida / bolsa / 9 bolsas = 3.6 ml de Vydate L diluido en 450 ml de agua), aplicando 50 ml / bolsa.



Figs 17 y 18. Aplicación de tratamientos.

A3) Siembra de plántulas de cafeto.

Pasados 15 días después de la aplicación de cada uno de los tratamientos, se procedió a la siembra de plántulas de cafeto en estado de conchas variedad Tekisic en cada una de las 54 bolsas, las cuales estaban ya debidamente identificadas y colocadas según el plano de campo (Figs. 19 y 20).



Figs 19 y 20. Siembra de plántulas de cafeto en estado de concha.

B) Post siembra.

Los tratamientos se aplicaron 15 días después de la siembra de las plántulas en estado de concha.

B1) Llenado de bolsas, colocación dentro de macetas y Siembra de plántulas de cafeto.

El llenado de bolsas se realizó de la misma forma que en el experimento de Presiembra. Después de la colocación de las bolsas, de la identificación de cada una de ellas y un riego previo a cada bolsa de 200 ml de agua, días antes, se procedió a la siembra de las plántulas de cafeto en estado de concha variedad Tekisic en cada una de las 54 bolsas.

B2) Aplicación de los tratamientos.

Pasados 15 días después de la siembra de las 54 plántulas de café y con un riego de 3 veces a la semana, se aplicaron los 6 tratamientos a las repeticiones de cada uno de estos (Fig.21).

- T1= 0.24gr de PAZAM (*P. lilacinus*)/ 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T2= 0.3 gr. de PAZAM (*P. lilacinus*) / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T3= 0.4 gr. de PAZAM (*P. lilacinus*)/ 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T4= 0.6 gr. de PAZAM (*P.lilacinus*) / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T5= Testigo Absoluto Agua 450 ml aplicando 50ml / bolsa.
- T6 =Testigo Relativo Vydate L, (0.4ml del nematicida / bolsa / 9 bolsas = 3.6 ml de Vydate L diluido en 450 ml de agua), aplicando 50 ml / bolsa.



Fig 21. Aplicación de tratamientos en experimento Post siembra.

3.3 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

3.3.1 Diseño experimental.

Se monto el experimento con un diseño experimental completamente al azar con 6 tratamientos y 9 repeticiones, donde una repetición consistió de una bolsa con una planta.

3.3.2 Modelo estadístico

El modelo estadístico para el diseño de la investigación se presenta acompañado con las siguientes formulas matemáticas (Nuila, 1990).

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Resultado de la investigación en las unidades experimentales "j" y donde se indujeron con el tratamiento "i".

μ = Promedio de los resultados del experimento.

τ_i = Efecto de tratamiento en estudio "i".

ϵ_{ij} = Error experimental de la unidad experimental (i, j).

Cuadro 1. Distribución estadística del diseño completamente al azar.

Fuente de variación	G. L	Suma de cuadrados	Cuadrado de medias	F. Observada
Tratamientos	a -1	$1/n \sum Y_i^2 - Y_{..}^2/na$	S.C. trat/a - 1	C.M trat./C.M.E
Error experimental	a(n-1)	S.C. total –S.C tratamiento	S.C error exp./a(n-1)	
Total	an-1	$\sum \sum y^2_{ij} - Y_{..}^2/na$		

Donde: Y= El gran total.

Y_i = Total del tratamiento.

3.3.3 Factores en estudio.

Los factores en estudio fueron los diferentes tratamientos de la suspensión del hongo *P. lilacinus* aplicados en las plantas de cafeto.

3.3.4 Análisis estadístico.

A los resultados obtenidos de las variables en estudio se aplicó el análisis de varianza de manera individual.

También se utilizó dentro del recuento de datos de esta investigación la transformación de datos estadísticos por medio de la “transformación raíz cuadrática”, para algunos datos de parámetros que no podían ser procesados normalmente por el diseño de completamente al azar, entonces se utilizó: $Y=\sqrt{X+1}$; una vez transformados los datos se trabajan normalmente en el diseño hasta la obtención del ANVA (Oñoro, 1995).

Para la prueba de parasitismo de *Paecilomyces lilacinus* sobre *Meloidogyne sp.* se utilizó el método análisis de experimentos con datos apareados, el cual consiste en aparear unidades experimentales contiguas a muy similares y aplicar a cada una de las parcelas de cada par, el tratamiento en estudio, por sorteo.

Para realizar el análisis estadístico se determinan las diferencias entre cada dos valores apareados, considerando dichas diferencias como muestra de una población de diferencias; luego se obtiene el valor de “t calculada”, relacionado el promedio de las diferencias y el error estándar del promedio de la serie de diferencias obtenidas; luego este valor se compara con el límite mínimo de significación obtenido en la tabla de “t de student” de la siguiente forma:

Si $t_c > t(\text{tablas})_{\infty, n-1}$ (G.L); se rechaza la H_0 y en consecuencia se acepta H_1 .

Si $t_c < t(\text{tablas})_{\infty, n-1}$ (G.L); se acepta H_0 y se rechaza la H_1 .

(Nuila, 1990).

3.4 EVALUACIÓN DE DAÑOS EN EL PRIMER EXPERIMENTO.

Durante el desarrollo del experimento se observó que un porcentaje de las plantas se marchitaron repentinamente (Figs.22 y 23). Entonces se procedió a disminuir el riego y se aislaron raíces de plántulas enfermas para determinar la causa del problema.



Figs. 22 y 23. Plantas de café de los dos experimentos con síntomas de marchites.

3.4.1 Aislamiento de hongo de plántulas enfermas en PDA.

El aislamiento se realizó en medio de cultivo (PDA), identificándose como causante del problema al hongo *Fusarium spp* el cual provoca la enfermedad denominada fusariosis del café. En vivero provoca un estrangulamiento a nivel del cuello de las plantas infectadas, por lo que las hojas se ponen amarillas, se marchitan y mueren. Esta situación ocurrió en los dos experimentos (Fig.24).

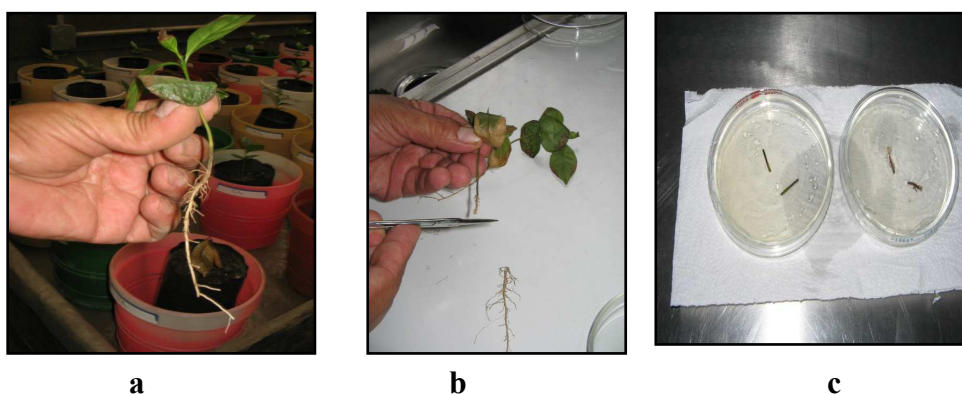


Fig. 24. Aislamiento de raíces de café enfermas en PDA: a) elección de planta enferma, b) corte de raíz, c) aislamiento en cajas Petri.



a



b

Fig. 25. Ultimas plantas enfermas de los experimentos: a) Plantas sobrevivientes, b) cultivo puro de *Fusarium spp*,

Por tratarse de otro hongo, fue imposible controlar el problema, debido a que no se pudo aplicar ningún fungicida químico para evitar la propagación de la enfermedad, causando daños irreversibles en las plantas. Al final solo sobrevivieron algunas plantas que resistieron la enfermedad, pero que no eran suficientes para continuar con la experimentación (Fig.25).

A causa de la agresividad que demostró el hongo *Fusarium spp*. sobre las plantas de cafeto, se opto por iniciar de nuevo el experimento. Por lo que se procedió a coleccionar nuevamente suelo, pero esta vez de plantas de vivero, siempre de la zona de Izalco. Se obtuvieron plantas de más de 1 año de edad en bolsas de polietileno con síntomas visibles y comprobados de presencia de nemátodos fitoparásitos (Agallas), (Figs.26 y 27).



Figs 26 y 27. Observación y elección en vivero de plantas de cafeto a utilizar.

3.5 MONTAJE DE UN NUEVO EXPERIMENTO CON LOS MISMOS TRATAMIENTOS, NÚMERO DE REPETICIONES Y DISTRIBUCIÓN.

A) Presiembra.

A1) Llenado de macetas.

Se utilizaron macetas plásticas color negro con las siguientes dimensiones: 13 X 12X10.5 cm. con capacidad de 1 litro las cuales fueron llenadas con el suelo obtenido de las plantas del vivero (Figs.28 y 29).



Fig. 28. Obtención del suelo

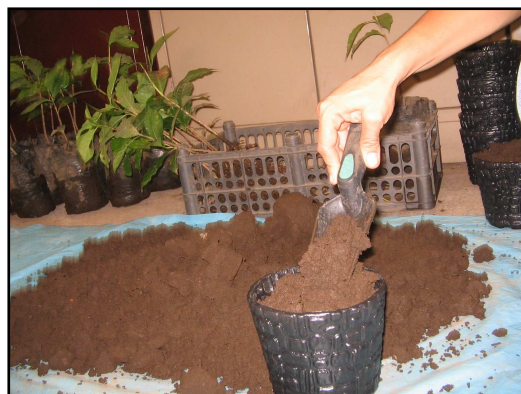


Fig.29.Llenado de macetas.

A2) Aplicación de los tratamientos.

Se aplicaron 6 tratamientos a las 9 repeticiones de cada uno de estos, quedando un total de 54 macetas conteniendo suelo a las que se les aplico (Fig.30).

- T1= 0.24gr de PAZAM (*P. lilacinus*)/ 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T2= 0.3 gr. de PAZAM (*P. lilacinus*) / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T3= 0.4 gr. de PAZAM (*P. lilacinus*)/ 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T4= 0.6 gr. de PAZAM (*P.lilacinus*) / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T5= Testigo Absoluto Agua 450 ml aplicando 50ml / bolsa.
- T6 =Testigo Relativo Vydate L, (0.4ml del nematicida / bolsa / 9 bolsas = 3.6 ml de Vydate L diluido en 450 ml de agua), aplicando 50 ml / bolsa.

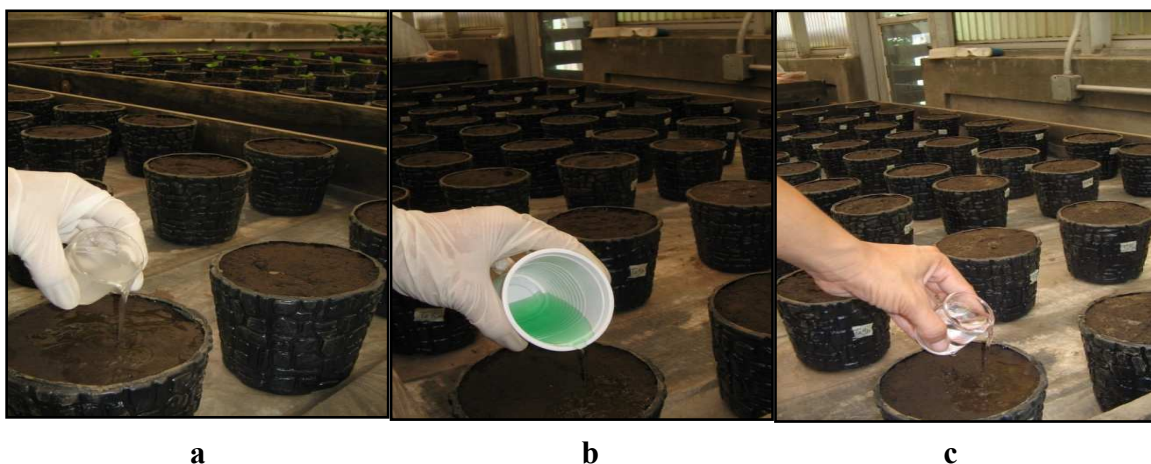


Fig .30. Aplicación de tratamientos en Presiembra: a) Suspensión de esporas del hongo *P.lilacinus*, b) Nematicida Vydate L, c) Agua.

A3) Siembra de plántulas de cafeto

Pasados 15 días después de la aplicación de cada uno de los tratamientos, se procedió a la siembra de una plántula de cafeto en estado de concha variedad Tekisic en cada una de las 54 macetas, las cuales estaban ya debidamente identificadas y colocadas según el plano de campo.

B1) Llenado de macetas

El llenado de macetas se realizó de la misma forma que en el experimento de Presiembra.

B2) Siembra de plántulas de café

Después de la colocación de las macetas y de la identificación de cada una de ellas, según el plano de campo y un riego previo a cada maceta, se procedió a la siembra de una plántula de café en estado de concha variedad Tekisic en cada una de las 54 macetas.

B3) Aplicación de los tratamientos

Pasados 15 días después de la siembra de las plántulas de café y con un riego de 3 veces a la semana, se aplicaron los tratamientos (Fig.31).

- T1= 0.24gr de PAZAM (*P. lilacinus*)/ 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T2= 0.3 gr. de PAZAM (*P. lilacinus*) / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T3= 0.4 gr. de PAZAM (*P. lilacinus*)/ 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T4= 0.6 gr. de PAZAM (*P.lilacinus*) / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por bolsa.
- T5= Testigo Absoluto Agua 450 ml aplicando 50ml / bolsa.
- T6 =Testigo Relativo Vydate L, (0.4ml del nematicida / bolsa / 9 bolsas = 3.6 ml de Vydate L diluido en 450 ml de agua), aplicando 50 ml / bolsa.



Fig 31. Aplicación de tratamientos en Post siembra.

Durante la segunda experimentación se observó, nuevamente el ataque del hongo *Fusarium spp.*, pero esta vez fue con menor agresividad. Debido a esto, se descartó la experimentación de Pos siembra ya que se contaba con muy pocas repeticiones para ser evaluado. Por lo que se optó por procesar únicamente el experimento Presiembra (Figs.32).



a



b

Fig.32. Plantas de café enfermas: a) Planta afectada por *fusarium*, b) Plantas de café de la segunda experimentación.

3.6 FASE DE LABORATORIO.

3.6.1 Procesamiento de los diferentes parámetros evaluados.

Las macetas con las plantas permanecieron durante 6 meses en el invernadero. Después de ese periodo se procedió a evaluar los siguientes parámetros:

- Altura de plantas (cm.)
- Peso de raíces , completo y de la parte aérea (gr.)
- Evaluación de daños en las raíces de acuerdo a una escala, (la cual consistió en el número de agallas presentes en las raíces de cada planta).
- Determinación de la población de nemátodos en el suelo durante el estudio (métodos de incubación y centrifugación-flotación en azúcar) (Ver Anexo 3).

3.6.2 Altura de plantas (cm.).

Se utilizó una regla graduada, mediante la cual se tomaron las diferentes alturas a partir del ras del suelo o inicio del tallo de la planta hasta el punto de crecimiento (Figs.33 y 34).



Figs 33 y 34. Medición de alturas en las plantas de cafeto.

3.6.3 Peso de raíces y parte aérea (gr.).

Para la determinación del peso de las raíces de plantas de café, se utilizó una balanza semianalítica para colocar al inicio la planta completa y posteriormente la planta cortada en dos partes (aérea y raíces), para obtener los diferentes pesos (Figs.35 y 36).



Figs 35 y 36. Preparación de plantas para medición.



a)

b)

c)

Fig 37. Pesos de las diferentes partes de las plantas: a) Completa, b) Parte aérea, c) Raíces.

3.6.4 Evaluación de daños en las raíces de acuerdo a una escala, la cual consistió en el número de agallas presentes en las raíces de cada planta.

Para dicha evaluación se procedió a la observación directa de las raíces de las plantas con la ayuda del microscopio estereoscopio, ya que a simple vista resulta difícil determinar la presencia de agallas de nemátodos *Meloidogyne* en las raíces. Posteriormente, se procedió a hacer un recuento de las masas de huevos presentes en las raíces (Figs.38 y 39).



Figs 38 y 39. Observación al microscopio estereoscopio de una raíz de café con presencia de masas de huevo del nemátodo *Meloidogyne sp.*

3.6.5 Control de Calidad del Producto PAZAM (*P.lilacinus*).

Debido al problema de contaminación de las plantas en estudio con el hongo *fusarium spp.* Se opto por realizar una prueba de control de calidad del producto PAZAM (*P.lilacinus*), para determinar la pureza de la cepa utilizada en la investigación y así descartar la posible contaminación de este producto. Se hicieron aislamientos del hongo en ajas petri conteniendo PDA. Para ello se utilizo una pequeña cantidad del producto, el cual fue disuelto en agua destilada estéril y posteriormente se colocaron pequeñas gotas de la dilución dentro de las cajas conteniendo el PDA (Figs.40 y 41).



Figs 40 y 41. Aislamiento de *P.lilacinus* a partir de producto PAZAM en PDA.

3.6.6 Prueba de parasitismo de *Paecilomyces lilacinus* sobre *Meloidogyne sp.*

Se tomo una caja Petri conteniendo cultivo puro de *P. lilacinus*, y se le agregaron 15 ml de agua destilada estéril, luego se agito para separar las esporas, inmediatamente la suspensión se vació en un beaker en donde se lleno hasta 100 ml (Figs.42 y 43).

Se colectaron individualmente masas de huevos y se colocaron dentro de pequeños tamices de 2cm de diámetro y luego dentro de cajas petri plásticas de 5 cm. de diámetro (Fig.44 y 45).

Se instaló un experimento con diseño de pares apareados, con dos tratamientos y 8 repeticiones. Los tratamientos fueron:

- 1- Masa de huevos de *Meloidogyne sp.* expuestas a suspensión de esporas de *Paecilomyces lilacinus*.

- 2- Masa de huevos de *Meloidogyne sp.* expuestos a agua destilada estéril

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- a) Número de larvas eclosionadas por repetición y por tratamiento, durante una semana (Figs.46 y 47).

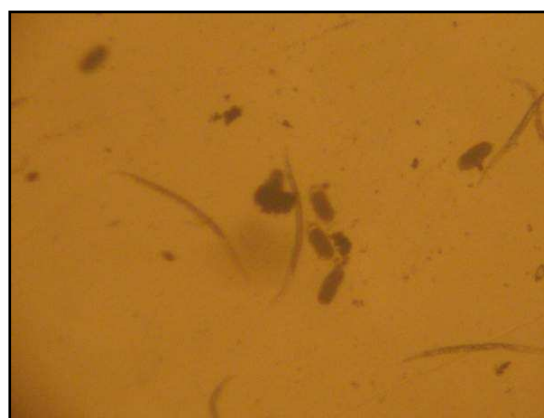
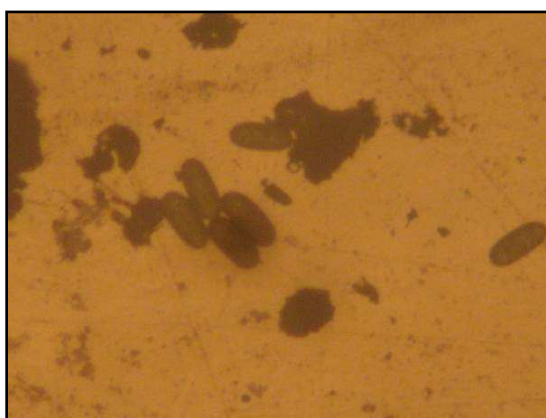
La idea para la realización de esta prueba fue adaptada de un estudio realizado por Tsai quien en 2008, publico una investigación basada en control de *Meloidogyne* utilizando cítricos.



Figs 42 y 43. Preparación de la suspensión de esporas de *P.lilacinus*.



Figs 44 y 45. Pequeñas cajas petri plásticas, conteniendo los tamices con las masas de huevos de *Meloidogyne sp.* y la suspensión de esporas con *P.lilacinus*.



Figs 46 y 47. Masas de huevos y nematodos eclosionados de *Meloidogyne sp.* Observados al microscopio estereoscópico durante la prueba.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

P.lilacinus es considerado un hongo de importancia para el control biológico de nemátodos del género *Meloidogyne* en diferentes cultivos. De acuerdo a lo anterior se puede presentar o tomar en cuenta como una herramienta más que podría ser incorporada para el control de estos nemátodos, en viveros de café y en plantaciones establecidas. Sin embargo, antes de utilizarlo es preciso conocer su forma de acción y el momento oportuno para aplicarse o forma de utilizarse para que sea efectivo.

En el caso del presente estudio, en los diferentes parámetros evaluados se obtuvieron resultados bastante variados, aunque no de gran diferencia entre algunos de los tratamientos, tal es el caso del primer parámetro evaluado alturas de plantas 180 días después de siembra, en donde las alturas de las plantas de cafeto en los seis tratamientos no demostraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de estos (Cuadro A-5), siendo el T6 el que obtuvo la mayor altura de 8.48cm y el T2 la menor altura con 7.51cm(Cuadro A-4), a pesar que la diferencia se encuentra en menos de 1cm, la importancia de esta diferencia esta en que el T6 es el nematicida Vydate L y el T2 es una dosis del hongo *P.lilacinus*, por lo tanto se puede pensar que no hubo mayor presencia de nematodos que influyera en el crecimiento de las plantas(figura A-16).

Para el parámetro de peso total de las plantas de cafeto se pudo observar que el T6 obtuvo el mayor peso total con 1.36gr en promedio y el T1 el menor con 1.14gr (Cuadro A-6), resultando la misma situación que en el parámetro anterior no encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el peso total (Cuadro A-7 y figura A-17).

Con respecto al peso de la parte aérea de las plantas de cafeto el T4 obtuvo el mayor peso con 1.12gr y el de menor peso fue el T1 con 1.01gr (Cuadro A-8), en este caso las diferencias de peso se han dado entre los tratamientos de las dosis del hongo *P.lilacinus*, a pesar de no ser muy grandes, ya que con respecto a los demás tratamientos las diferencias no son estadísticamente significativas (Cuadro A-9 y figura A-18).

En el parámetro de peso de raíces se observó que en el T6 obtuvo un peso de 0.16gr, considerado como el mayor peso y los tratamientos T2, T3 y T5 obtuvieron los menores pesos de 0.11gr cada uno (Cuadro A-10), resultando una pequeña diferencia entre dichos tratamientos aunque no se consideran estadísticamente significativas (Cuadro A-11 y figura A-19).

En el caso del parámetro número de masas de huevos de *Meloidogyne* por planta, si se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos (Cuadro A-14), debido a la presencia de masas de huevos del nematodo en las raíces de las plantas (Cuadro A-12), la mayor cantidad de masas de huevo en promedio se observó en el T4 con 1.77 y la menor cantidad en el T6 con 1, a pesar de no ser tan marcadas las diferencias entre los tratamientos nuevamente se observa diferencia entre los tratamientos del hongo y el nematicida (Cuadro A-13 y figura A-20)

Otra situación similar se observó en el parámetro de número de nemátodos en 100gr de suelo, se pudo observar que los tratamientos T1 y T3, presentaron 1.28 en promedio siendo esta la mayor cantidad de nemátodos en el suelo, contenido en las macetas, en el caso del T6 se registró 1 en promedio (Cuadros A-15 y A-16), debido a la poca presencia de nemátodos en el suelo, la observación y registro de por lo menos uno de ellos era significativo para poder deducir la posible efectividad de los tratamientos, razón por la cual se concluyó que si existieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos (Cuadro 17 y figura A-21).

Los resultados anteriores pudieron deberse a la baja cantidad inicial de larvas de nemátodos que habían en el suelo al momento de colectarlo. Aunque se encontraron 5 larvas por 50 gramos de suelo probablemente esta cantidad no fue homogénea al momento de llenar las macetas. Por otra parte, la baja cantidad de masas de huevos y larvas encontradas por planta, también indica que muy pocos nemátodos parasitaron las raíces de las plantas durante el lapso de tiempo que duró el estudio. De acuerdo a Agrios (2001), el ciclo biológico de algunas especies de *Meloidogyne* en los trópicos es de aproximadamente de 25 días. Por lo tanto, si hubiese habido una mayor cantidad de larvas en el suelo al inicio del estudio; después de 6 meses hubiera habido un número indeterminado de masas de huevos y/o agallas en cada planta.

Sin embargo también es de hacer notar, que de acuerdo a las características biológicas de las especies de *Meloidogyne*, sus larvas L2 son móviles, se encuentran normalmente en el suelo y se movilizan por todas partes buscando raíces para alimentarse y reproducirse y cuando las encuentra se instalan al interior y completan su ciclo de vida. Si no encuentran raíces pueden morir de hambre. Esto también podría explicar el porque muy pocos nemátodos parasitaron las raíces de las plantas. Bajo las condiciones donde se llevo a cabo el estudio, las plantas no desarrollaron buen sistema radicular, esto indica que probablemente fuera del invernadero hubieran desarrollado mayor cantidad de raíces en corto tiempo y entonces aunque las densidades poblacionales de nemátodos hubieran sido muy bajas habrían sido parasitadas y de acuerdo al tiempo que duró el estudio se habrían desarrollado al menos 4 generaciones de *Meloidogyne*.

En estudios similares realizados por otros autores; lo que han hecho es llenar macetas con suelo, sembrar las plantas y después de un tiempo inocular una cantidad homogénea de nematodos en cada planta. Con esta metodología se asegura una infestación homogénea de todas las plantas.

Hernández (2004), en estudios de patogenicidad de cepas de *Meloidogyne* sobre plantas de café en macetas, inoculando 300 larvas por planta y en un lapso de 3 meses observó los efectos de daños sobre las plantas así como también la capacidad de reproducción sobre los nemátodos. Sin embargo en este tipo de estudios es necesario realizar una cría aparte de nemátodos para obtener la cantidad necesaria para inocular todas las plantas el mismo día.

A pesar de los inconvenientes que se presentaron, la necesidad de controlar los nematodos que atacan las plantas de cafeto en vivero mediante alternativas biológicas como el uso de hongos nematofagos es urgente, porque en la actualidad los productores controlan estos nematodos mediante la aplicación de nematicidas químicos sintéticos que en su mayoría están clasificados dentro de los más tóxicos (viñeta roja) y causan contaminación ambiental y problemas a la salud humana.

Los cafetos permanecen de 10 a 12 meses en el vivero y luego son sembrados en campo definitivo, por lo tanto si durante ese período están parasitados por nemátodos, entonces mueren en el campo y los suelos que no estaban infestados se contaminan y expanden la infestación en cafetos más viejos. Por lo tanto sería importante evaluar los efectos de *P.lilacinus* en plantas de vivero infestadas bajo condiciones de finca.

Hasta la fecha *P.lilacinus*, ha sido el único hongo probado ampliamente para el control de nemátodos bajo condiciones de campo. Sin embargo, en muchos experimentos este hongo no ha tenido éxito, al parecer se debe a que es difícil el establecimiento del hongo en el suelo.

Waingwright (1995), menciona que para el establecimiento en el suelo, es necesario adicionarle una fuente de carbono, con la esperanza de que la adición de nutrientes favorecerá el establecimiento rápido del hongo en el suelo.

La forma en la que fue aplicado, en presiembra es una estrategia muy importante, ya que se trata que el hongo se establezca en el suelo y ejerza su función. Sin embargo lo que habría que estudiar o verificar es cuanto tiempo antes de la siembra de plantas es que se debe aplicar.

Por otra parte habría que evaluar su acción como curativo, es decir aplicado sobre plantas que presentan raíces con síntomas de agallamiento.

El ataque de *Fusarium spp.* sobre las plantas indica que el suelo estaba infestado con este hongo, el cual es un género que comprende diversas especies y algunas de ellas son patogénicas a cafetos tanto en vivero como en campo.

El hecho que provocó la muerte de los cafetos en un lapso de 40 días indica que en las macetas se desarrollaron las condiciones ideales (humedad), para que se volviera patogénico sobre las plántulas. La presencia de *Fusarium* y de nematodos fitoparásitos en suelos para llenar bolsas para vivero, se presenta como una limitante para obtener plantas sanas mediante la utilización de diferentes métodos de control. Si se utiliza a *P.lilacinus*, para controlar nematodos, no se podría utilizar fungicidas químicos-sintéticos para controlar un eventual ataque de *Fusarium*, por lo tanto habría que utilizar enemigos naturales de *Fusarium*, ya que el hecho de haberse manifestado agresivamente en este estudio indica que *P.lilacinus* no le fue antagónico.

La presencia de *Fusarium spp*, atacando plantas fue la pauta para pensar que el producto utilizado (PAZAM), estaba contaminado, sin embargo la prueba de control de calidad que se le hizo demostró, que el producto no estaba contaminado. Esta situación permite inferir que de acuerdo a las formulaciones, no todos los productos microbiológicos pueden estar libres de contaminantes, por lo tanto el control de calidad se hace necesario, sin embargo no todas las personas que compran estos productos pueden verificar su calidad.

En la prueba de parasitismo de *P. lilacinus* sobre *Meloidogyne sp.* se obtuvieron resultados que indican la forma de acción del hongo. De acuerdo al análisis de los cuadros 19 y 20, a los 4 y 7 días de exposición no hubo diferencia entre los tratamientos, sin embargo a partir de los 9 y 13 días de exposición se observó que ya hubo diferencia significativa entre los tratamientos. El hecho de que la eclosión de larvas de *Meloidogyne sp.*, de masas de huevos expuestas a suspensión de esporas haya sido bien baja con respecto a las masas de huevos expuestas a únicamente agua, indica que *P.lilacinus* colonizó las masas y parasitó los huevos, evitando la eclosión de larvas, pero esa colonización tomo un tiempo, a los 9 días de exposición, en los testigos se encontraron un promedio de 33 larvas de *Meloidogyne sp.*, mientras que en *P.lilacinus* solamente 5 larvas. De la misma forma a los 13 días de exposición en el testigo se encontró un promedio de 84 larvas por repetición, mientras que en *P.lilacinus* solo 5 larvas en promedio (Cuadros 21 y 22). Si se hubiera dejado por más días de exposición, la eclosión hubiera sido más reducida o llegada aun punto en donde no hubiera habido más eclosiones (figura A-22).

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados se puede concluir lo siguiente:

- No se observaron efectos de los nemátodos en el crecimiento de plantas y peso aéreo – raíces entre los tratamientos, debido probablemente a las bajas infestaciones de *Meloidogyne* en las raíces de las plantas.
- No se pudo observar el efecto de *P.lilacinus* sobre masas de huevos presentes en las raíces de las plantas, debido a que estas fueron muy pocas.
- En el primer ensayo las plantas fueron atacadas por el hongo *Fusarium spp.*, situación que perjudicó la investigación.
- El control de calidad del producto PAZAM (*P.lilacinus*), demostró que no estaba contaminado.
- El estudio de parasitismo in Vitro demostró que la exposición de masas de huevos de *Meloidogyne sp.* a esporas del hongo *P. lilacinus*, redujo la eclosión de larvas.
- La baja infestación de nemátodos influyó en los resultados esperados en el presente trabajo.
- Probablemente ocurrió un efecto sinérgico entre el hongo *Fusarium* y los nemátodos, que provocó la muerte de las plantas en algunos de los ensayos.
- El nemátocida Vydate es aun una alternativa muy efectiva para el control de *Meloidogyne spp.*

6. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados y conclusiones obtenidos en este trabajo se puede recomendar lo siguiente:

- Para hacer este tipo de estudios en macetas, es necesario inocular nemátodos en cada una, para asegurar que la infestación en las plantas sea homogénea.
- Hacer estudios con *P.lilacinus* en plantas de café con presencia ya establecida de masas de huevos.
- Evaluar la capacidad de colonización del hongo en el suelo a condiciones normales de ambiente.
- Estudiar la supervivencia del hongo *P.lilacinus* en el suelo.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Aballay, E. 2005. Uso de plantas antagónicas para el control de nemátodos fitoparásitos en vides. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 42 p.
2. Agrios, G.N. 2001. Fitopatología. Editorial Limusa, Noriega Editores. México. 838 p.
3. Anderson, Traute-Heidi; Domsch, K. H.; Gams, W. 1995. Compendium of Soil *Fungi*. Lubrecht & Cramer Ltd. ISBN 3-9803083-8-3.
4. Brown, R.H. 1987. Control strategies in low-value crops. In Brown, R.H. and B.R. Kerry; Principles and practice of nematode control in Crops. London: Academic Press. P. 355-387.
5. Cabanillas, E., K. R. Barker, and M. E. Daykin. 1988. Histology of the interactions of *Paecilomyces lilacinus* with *M. incognita* on tomato. Journal of Nematology 20:362-365.
6. Campos, V.P; Sivapalan, P; Gnanapragasam, N.C. 1990. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge (eds). C.A.B. International. P. 387 – 430.
7. Caveness, F. E. and Jensen, H.J. 1955. Modification of the centrifugal flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. Proc. Helm. Soc. Wash. 22:87-89.
8. Chavarría-Carvajal, J.A. 1997. Use of organic amendments and naturally occurring aromatic compounds for control of plant-parasitic nematodes: Effects on microbial activity and soil enzymes. Ph.D. Thesis. U.S.A, Auburn University, Alabama. 189 p.
9. Chavarría-Carvajal, J.A. and R. Rodríguez-Kábana. 1998. Alginate films for assessment of parasitism of *Meloidogyne incognita* using four organic amendments. Nematologica. 28(1):41- 48.
10. Domínguez, J.A, et al. 1990. Leguminosas de cobertura asociadas con tomate var. “dina guayabo” y su efecto sobre *Meloidogyne*. Turrialba, C.R. 40(2):217-221.
11. Esser, R.P; El-Gholl, N.E. 1993. *Paecilomyces lilacinus*, a fungus that parasitizes nematode eggs. Fla. Dept. Agric. & Consumer Serv. Division of plant industry. Nematology Circular No.203.
12. Giraldo F, MA; Leguizamón C, J.E; Chávez C, B. 1998. Control de *Meloidogyne* spp. en almácigos de café con el hongo *Paecilomyces lilacinus*. (en línea). CENICAFE Vol. 49(2) # 85-101. Colombia. Consultado 10 de Marzo 2008. Disponible en <http://www.cenicafe.org>

13. Hernández, A; Rivera, A. 2001. Nemátodos. In. Combate Integrado de plagas, enfermedades, nemátodos y malezas del cafeto. Edit. Por Fundación Salvadoreña para investigaciones del café. Santa Tecla. El Salvador. P 70 – 90.
14. Herrera, S. IC. 1997. Efecto de coberturas vivas de leguminosas en el control de nemátodos fitoparásitos del café. In. Memoria XVIII Simposio Latinoamericano de caficultura, ICAFE, IICA. Costa Rica, 1997. p. 69- 77
15. Hilje, L. 1995. Control Biológico. Escuela de Posgrado. Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza (CATIE). Turrialba, C.R.
16. Infoagro. 2008. Nemátodos. (en línea). Consultado 6 de Enero de 2008. Disponible en [http:// www.infoagro.com](http://www.infoagro.com)
17. Jansson, H.B.; Lopez-Llorca, L.V. 2001. Biology of Nematophagous Fungi. In: Mycology: Trichomycetes, other Fungal Groups and Mushrooms. JK Misra & BW Horn, (eds.). Pp. 145-173. Science Publishers, Enfield.
18. Jatala, P. 1986. Biological control of nematodes, pp. 303-308. In Sasser, J. N. and C. C. Carter (Eds).
19. Marban, N. 1999. Efecto de coberturas vivas de leguminosas en el control de algunos fitonemátodos del café en Nicaragua. *Nema trópica* 29(2):223-232.
20. Nordbring-Hertz, et, al. 1995. Nematophagous fungi. Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen. Film Nr C 1851.
21. Nuila de Mejía, J.A.; Mejía Mejía, M.A. 1990. Manual de Diseños Experimentales con aplicación a Agricultura y Ganadería. Universidad de El Salvador. 258 p.
22. Oñoro, P. 1995. Curso de diseños experimentales. Escuela de Posgrado. Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza (CATIE). Turrialba, C.R.
23. Obregón Gómez, M. 2002. Seminario: Uso y Manejo de Bioprotectores en la Agricultura. Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica del INA. Cartago, C.R. 42 p.
24. PROCAFE.1999.Cartillas cafetaleras.Serie: Establecimiento del cafetal. Santa Tecla.El salvador.7p.
25. Redacción de referencias bibliográficas. (en línea). IICA/CATIE. Turrialba. C. R. Consultado el 19 de marzo de 2009. Disponible en http://biblioteca.catie.ac.cr/normas_de_redacción.html

26. Sandoval, S.C; Escobar, I.M.2002. Caracterización bioquímica de poblaciones de nemátodos del género *Meloidogyne* parásitos del cultivo de cafetos en la zona de Izalco. Tesis Ing. Agr. El Salvador, UES. 59 P.
27. Samson, R.A 1974. "*Paecilomyces* and some allied *hyphomycetes*". Studies in Mycology (Baarn: Centralbureau voor Schimmelcultures) 6: 119.
28. Stirling, GR 1990. Control biológico de nemátodos parásitos. CABI. U.K. 282p.
29. Santo-Pietro, K.A. 2008. *Paecilomyces* Species. (en línea). Consultado 12 de mayo de 2008. Disponible en http://www.newjerseymoldinspection.com/mold_news/paecilomyces...
30. Talavera Rubia, M.2003. Manual de Nematología Agrícola. Instituto de Investigación y formación agraria y pesquera. Islas Balears. 23 p.
31. Tsai. B.Y. 2008. Effect of peels of lemon, orange and grapefruit against *Meloidogyne incognita*. Department of plant pathology and microbiology. National Taiwán University, Taipei, Taiwán. Plant Pathology Bulletin 17:195-201.
32. Vázquez L.1996. Control biológico de plagas en Café. INISAV. La Habana, Cuba. 24 p.
33. Villain, L; Sarah, J.L; Decazy, A; Sierra, S.1996. Evaluation of grafting on *Coffea canephora* var. Robusta, and chemical treatment for control of *Pratylenchus* spp. In. *C. arabica* cropping systems. Proceedings of thirrd International Nematology Congress. Gosier, Guadeloupe, 7-12, 1996 Julio, 1996.
34. Waingwright, M.1995. Introducción a la biotecnología de los hongos. Editorial Acribia. España.189 p.
35. Widmer, T.L., N.A. Mitkowski, and G.S. Abawi. 2002. Soil organic matter and management of plant-parasitic nematodes. J. Nematol. 34(4):289-295.
36. Wikipedia.2009. *Paecilomyces lilacinus*. (en línea). Consultado 8 de abril de 2009. Disponible en http://www.en.wikipedia.org/wiki/paecilomyces_lilacinus
37. Wikipedia. 2008. *Meloidogyne*. (en línea). Consultado 6 de enero de 2008. Disponible en <http://www.es.wikipedia.org>.

8. ANEXOS

Cuadro A- 1. Plano de campo para E – 1 Y E -2.

T4R1	T6R2	T1R3	T2R3	T4R4	T5R6
T2R1	T4R8	T6R9	T4R2	T2R8	T2R5
T3R9	T6R6	T1R8	T1R5	T3R4	T6R4
T5R7	T1R9	T6R1	T2R7	T5R2	T2R2
T4R9	T5R3	T3R8	T2R4	T6R5	T5R4
T6R7	T5R8	T1R4	T1R6	T4R5	T4R3
T1R2	T6R8	T3R5	T3R6	T3R7	T3R3
T3R2	T1R1	T2R6	T4R6	T5R9	T6R3
T2R9	T5R5	T1R7	T3R1	T4R7	T5R1



Fig. A-1



Fig. A-2

Figuras A-1 y A-2. Distribución de macetas según plano de campo.

A-1. Preparación y Aplicación de los tratamientos.

Para la preparación de las diferentes dosis de *Paecilomyces lilacinus*, el cual fue el hongo nematófago que se evaluó, se preparó suspensión de esporas de dicho hongo, obtenidas de un producto comercial llamado “PAZAM”, el cual es un nematocida microbiológico elaborado por ZAMORANO, cuya composición consiste en:

Ingrediente activo	P/P
Conidias de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	12.5%
Ingrediente Inerte.....	87.5%
Total.....	100.0%



Figura A-3. Producto PAZAM.

Para efectuar las aplicaciones de los diferentes tratamientos en las dos experimentaciones se distribuyeron las dosis de la siguiente manera:

- T1= 0.24gr de PAZAM / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por maceta.
- T2= 0.3 gr. de PAZAM / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por maceta.
- T3= 0.4 gr. de PAZAM / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por maceta.
- T4= 0.6 gr. de PAZAM / 500 ml de agua destilada, aplicando 50 ml de la suspensión del producto por maceta.
- T5= Testigo Absoluto Agua 450 ml aplicando 50ml / maceta.
- T6 =Testigo Relativo Vydate L, (0.4ml del nematicida / maceta / 9 macetas = 3.6 ml de Vydate L diluido en 450 ml de agua), aplicando 50 ml / maceta.



a



b



c



d



e



f

Figuras A-4. Preparación de la suspensión del hongo *Paecilomyces lilacinus*.

a, b, c) Pesaje de las diferentes cantidades del producto PAZAM, que se utilizaron para los tratamientos; d) Medición de agua destilada, e) mezcla de las diferentes concentraciones de la suspensión del producto PAZAM, f) Los 4 tratamientos utilizados.



a



b



c



d



e



f

Figuras. A-5. **Preparación de la dilución del nematicida – insecticida Vydate L.**
a) Nematicida –Insecticida Vydate L; b, c, d) proceso de extracción y dilución del nematicida en 450 ml de agua; f) Tratamiento listo para aplicación.

A- 2. Manejo agronómico de los experimentos

Para dar el mantenimiento requerido por las plántulas de café variedad tekisic, se llevó a cabo un programa de fertilización el cual es sugerido por PROCAFE, este consistió en:

Cuadro A-2. Programa de fertilización de plántulas de café.

Aplicación	Días después del trasplante	Fertilizante	Gramo/Bolsa
Primera	15	15-15-15	5
Segunda	45	15-15-15	5
Tercera	75	Sulfato de Amonio	5
Cuarta	105	Urea	2

Fuente: PROCAFE. Cartillas cafetaleras



Figura. A-6. Fertilización de plántulas de café.

El riego consistió en la aplicación 3 veces por semana de 200ml de agua por cada maceta y la limpieza de maleza dentro de las macetas.



Figura A-7. Riego con agua, aplicación de 100ml / planta.

Toma de datos semanal de los experimentos

A partir del establecimiento de los experimentos se inició la toma de datos de cada una de las actividades que se desarrollaban y de cada situación que se fue presentando, como es el caso del ataque del hongo *Fusarium spp.* El cual provocó la muerte de muchas plantas de los experimentos.

Cuadro A-3. Formato de control de datos.

FECHA	T1	T2	T3	T4	T5	T6
PLANTA SANA						
PLANTA ENFERMA						
PLANTA MUERTA						
OBSERVACIÓN						
RIEGO						

A- 3. Determinación de la población final de nemátodos en el suelo durante el estudio (método centrifugación –flotación en azúcar).

Para la determinación del número de nemátodos en 100 gr. de suelo, procedente de cada una de las macetas que fueron utilizadas en el estudio, se ocupó una técnica de extracción muy utilizada para dicho fin, la de centrifugación- flotación la cual consiste en:

- Se Pesa una muestra de suelo 100gr en este caso, el cual se deposito dentro de un recipiente limpio y con capacidad de por lo menos 3 litros.

**a****b**

Figuras. A-8. Procedimiento de la extracción de nemátodos: a) obtención de la muestra de suelo; b) procedimiento de lavado de la muestra.

- Se Desmenuzaron manualmente los terrones del suelo y se agrego 2 litros de agua, también se lavaron las manos sobre el recipiente, se agito el contenido y deajo reposar por 1 minuto.

**Fig. A-9**

Figura A-9. Lavado de la muestra de suelo para luego filtrarla en los tamices.

- Se prepararon los tamices (20mesh, 80 mesh, 200 mesh y 500 mesh) que fueron utilizados para decantar la mezcla de suelo y agua que se preparo.



Figura A-10. Tamices utilizados.

- Se Vertió el líquido para decantarlo, a través del juego de tamices anteriormente mencionados, obteniéndose el residuo de agua y suelo que se mantuvo retenido en el tamiz de 500mesh , posteriormente fue lavado con la ayuda de una pizeta llena de agua, para recoger el residuo en un beaker de 100 ml.



a



b



c

Figura. A- 11. Procedimiento de tamizado de la muestra: a) decantación de muestra en los tamices, b) lavado de la muestra con una pizeta conteniendo agua, c) obtención de muestra.

-Se Paso el líquido del beaker (solución con nemátodos) a cuatro tubos para centrifuga de 50 ml cada uno, balanceando los tubos conteniendo la solución más una pequeña cantidad de kaolina, la cual es un polvo que ayuda a fijar la parte sólida de la solución en la base del tubo durante la centrifugación, por último se centrifugo durante 3 minutos a 3000 RPM.



a

b

c

Figura A-12. Procedimiento para centrifugar la muestra: a) distribución del líquido en los tubos, b) aplicación de kaolina dentro de los tubos, c) agitación de los tubos y posterior colocación dentro de la centrifuga.

- Se decantaron los tubos eliminando el agua, para después llenarlos nuevamente pero esta vez con solución de agua- azúcar previamente elaborada, se desprendió el suelo que estaba en la base del tubo, nuevamente se balancearon los tubos y colocaron dentro de la centrifuga para una segunda centrifugación pero esta vez con 2 minutos a 3000 RPM.



a



b

Figuras A-13. Procedimiento de la segunda centrifugación de la muestra: a) aplicación de la solución azucarada para cada tubo, b) colocación de tubos para la segunda centrifugación.

-Se decanto el líquido obtenido sobre un tamiz de 500mesh



Figura A-14. Decantación de muestra sobre tamiz.

-Se Lavó el tamiz con la ayuda de una pizeta conteniendo agua, luego se recolecto el contenido restante del líquido y se vertió dentro de un vidrio de recuento o vidrio de Siracusa para la posterior observación, identificación y conteo de los nemátodos ahí presentes.



a

b

c

Figura. A-15. a) Lavado, b) Tamizado y c) Observación de muestra obtenida.

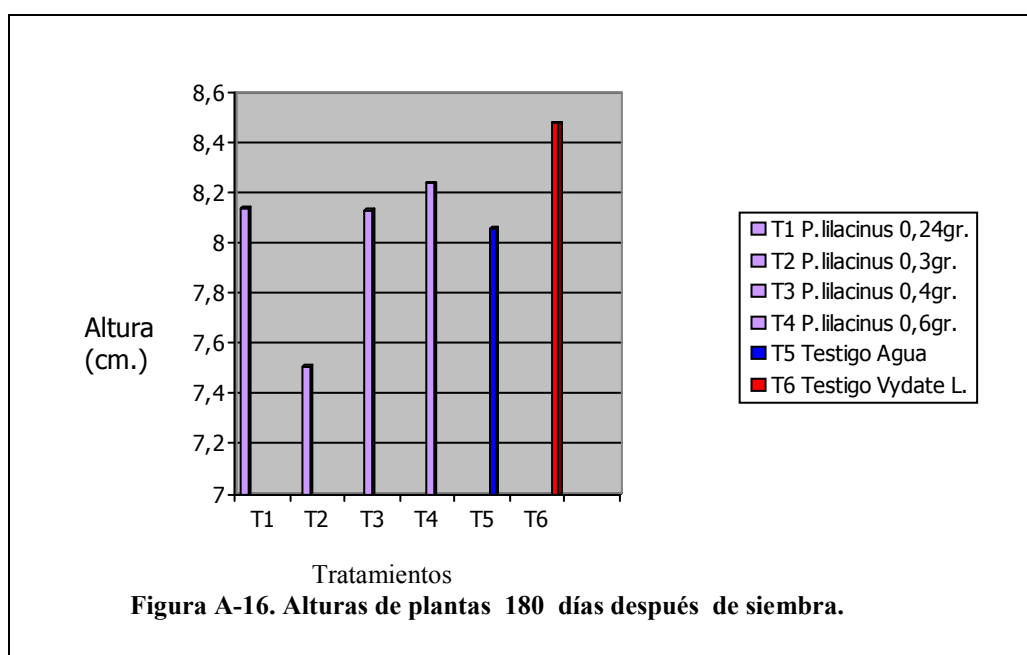
CUADRO A-4. ALTURAS DE PLANTAS 180 DÍAS DESPUES DE SIEMBRA.

TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAL (Y.i)	Media (Y.i)
T1	9.3	7.6	8.8	7.6	7.7	8.6	7.4	57	8.14
T2	6.8	5.8	7.8	6.6	8.7	9.6	7.3	52.6	7.51
T3	9.3	7.7	8.9	8.7	9.6	6.8	5.9	56.9	8.13
T4	9.2	6.9	6.8	8.4	10.5	8.1	7.8	57.7	8.24
T5	7.2	7.6	9.8	7	7.6	7.8	9.4	56.4	8.06
T6	7.4	10.8	10.1	5.8	7.9	8.9	--	50.9	8.48
TOTAL (Y.j)	49.2	46.4	52.2	44.1	52	49.8	37.8	331.5	48.56

CUADRO A-5. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE ALTURA DE PLANTAS.

F. de V.	G.L	S.C	C.M	FC	Ftablas	
					5%	1%
Tratamientos	5	5.58	1.12	0.33 N.S	2.48	3.58
Error Experimental	36	120.73	3.35			
Total	41	126.31				

N.S = No significativo. Como "F" calculada es menor que "F" tablas, los resultados son No significativos, lo que indica que no existen diferencias entre las medias de los tratamientos, concluyendo que no existe variación en las alturas de las plantas en estudio.



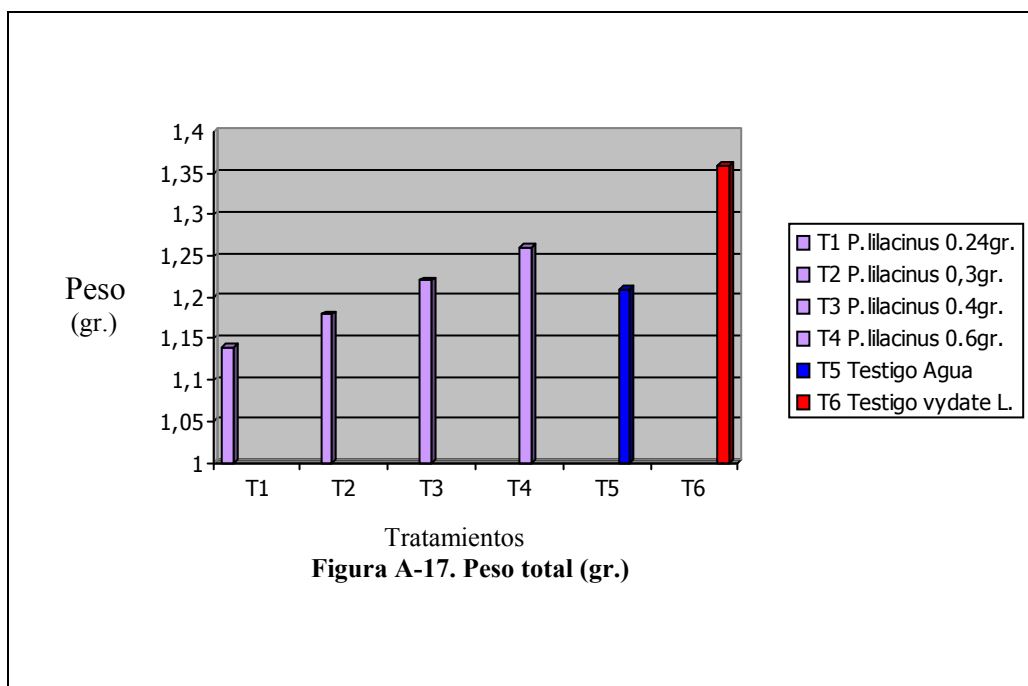
CUADRO A-6. PESO TOTAL (gr.)

Tratamientos	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAL (Y.i)	Media (Y.i)
T1	1.07	1.31	1.29	1.08	0.90	1.23	1.08	7.96	1.14
T2	0.98	1.37	1.16	1.50	1.19	0.99	1.10	8.29	1.18
T3	1.58	1.06	1.23	1.20	1.33	1.06	1.09	8.55	1.22
T4	1.11	1.21	0.82	1.79	1.49	1.12	1.31	8.85	1.26
T5	1.43	1.14	1.34	1.30	1.04	1.25	0.98	8.48	1.21
T6	1.31	1.71	1.54	0.73	1.34	1.54	---	8.17	1.36
TOTAL(Y.j)	7.48	7.8	7.38	7.6	7.29	7.19	5.56	50.3	7.37

CUADRO A-7. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE PESO TOTAL (gr.)

F. de V.	G.L	S.C	C.M	FC	F Tablas	
					5%	1%
Tratamientos	5	0.07	0.014	0.14 N.S	2.48	3.58
Error Experimental	36	3.47	0.096			
Total	41	3.54				

N.S = No significativo. Como "F" calculada es menor que "F" tablas, los resultados son No significativos, lo que indica que no existen diferencias entre las medias de los tratamientos. Por lo que se concluye que no hay diferencias entre los pesos totales de las plantas de café.



CUADRO A-8. PESO DE PARTE AEREA (gr.)

TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAL (Y.j)	Media (Y.i)
T1	0.97	1.18	1.11	0.96	0.79	1.10	0.96	7.07	1.01
T2	0.91	1.26	1.06	1.35	1.08	0.88	0.99	7.53	1.07
T3	1.41	0.99	1.13	1.07	1.19	0.96	0.97	7.72	1.10
T4	0.92	1.14	0.72	1.53	1.34	1.03	1.14	7.82	1.12
T5	1.15	1.05	1.22	1.26	0.96	1.11	0.92	7.67	1.09
T6	1.15	1.51	1.38	0.65	1.17	1.33	--	7.19	1.03
TOTAL(Y.j)	6.51	7.13	6.62	6.82	6.53	6.41	4.98	45	6.42

CUADRO A-9. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE PESO DE PARTE AEREA (gr.)

F. de V.	G.L	S.C	C.M	FC	F Tablas	
					5%	1%
Tratamientos	5	0.07	0.014	0.009 N.S	2.48	3.58
Error Experimental	36	50.85	1.41			
Total	41	50.92				

N.S = No significativo.

Como "F" calculada es menor que "F" tablas, los resultados son No significativos, lo que indica que no existen diferencias entre las medias de los tratamientos, por lo que se concluye que no existen diferencias significativas entre los pesos de la parte aérea de las plantas.

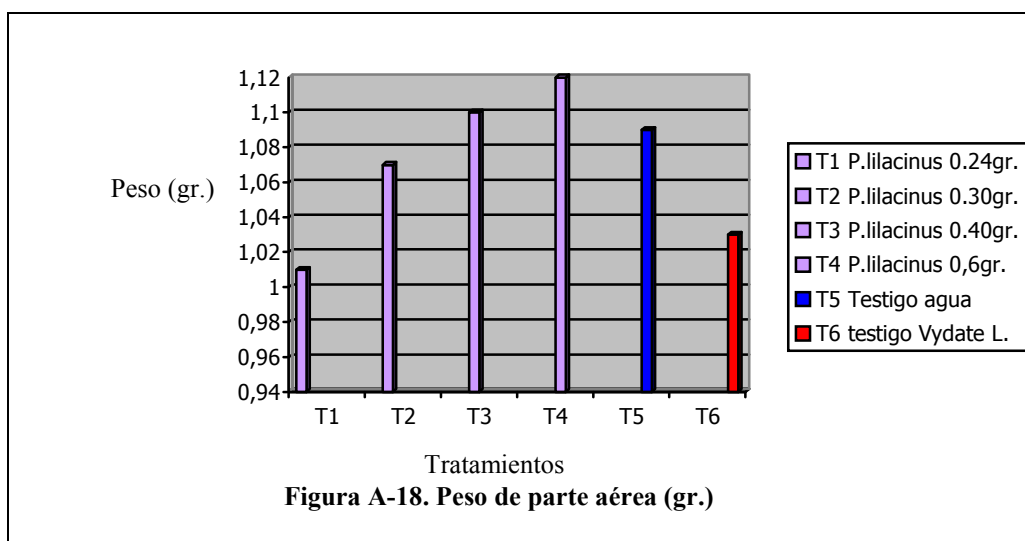


Figura A-18. Peso de parte aérea (gr.)

CUADRO A-10. PESO DE RAICES (gr.)

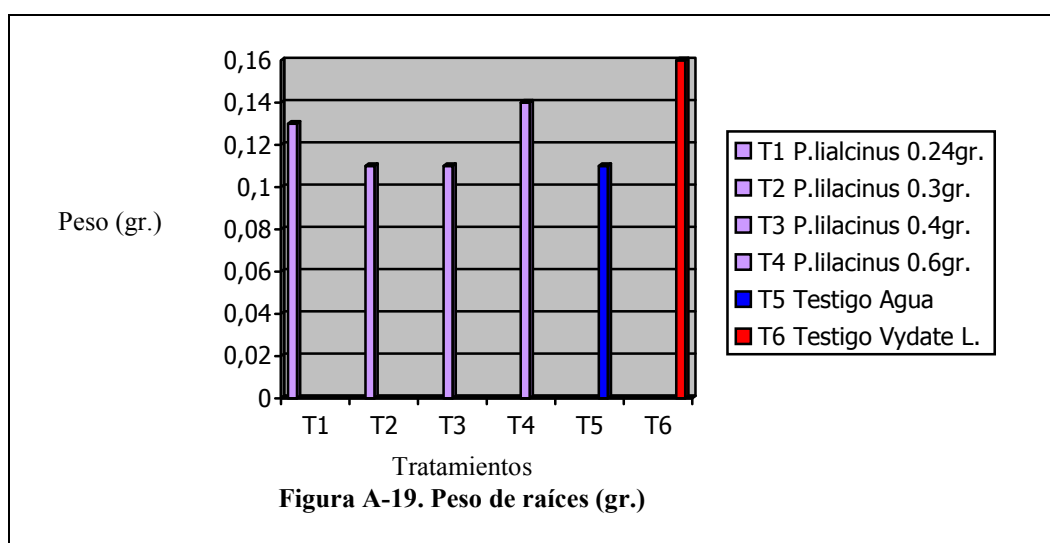
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAL (Y.i)	Media (Y.i)
T1	0.12	0.15	0.16	0.13	0.11	0.13	0.15	0.95	0.13
T2	0.09	0.14	0.12	0.16	0.10	0.08	0.11	0.8	0.11
T3	0.17	0.08	0.10	0.12	0.14	0.09	0.11	0.81	0.11
T4	0.10	0.12	0.10	0.27	0.17	0.09	0.16	1.01	0.14
T5	0.14	0.10	0.13	0.08	0.10	0.13	0.08	0.76	0.11
T6	0.14	0.23	0.18	0.08	0.15	0.15	--	0.93	0.16
TOTAL (Y.i)	0.76	0.82	0.79	0.84	0.77	0.67	0.61	5.26	0.76

CUADRO A-11. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE PESO DE RAICES (gr.)

F. de V.	G.L	S.C	C.M	FC	F Tablas	
					5%	1%
Tratamientos	5	0.01	0.002	0.1N.S	2.48	3.58
Error Experimental	36	0.73	0.02			
Total	41	0.74				

N.S = No significativo.

Como "F" calculada es menor que "F" tablas, los resultados son No significativos, lo que indica que no existen diferencias entre las medias de los tratamientos, por lo que se concluye que no existen diferencias entre los pesos de las raíces de las plantas de café.



Cuadro A-12. Número de masas de huevos de *Meloidogyne* por planta

TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAL (Y.i)	Media (Y.i)
T1	0	0	0	0	0	2	1	3	
T2	2	2	0	3	1	2	0	9	
T3	4	0	2	3	0	1	5	15	
T4	3	1	3	1	2	5	1	16	
T5	2	1	4	0	4	4	1	16	
T6	0	0	0	0	0	0	--	0	
TOTAL									

Transformación de datos por medio de la Transformación
"Raíz cuadrática"

$$Y=\sqrt{X+1}$$

Transformando datos:

$$Y=\sqrt{5+1}=2.45$$

$$Y=\sqrt{4+1}=2.24$$

$$Y=\sqrt{3+1}=2$$

$$Y=\sqrt{2+1}=1.73$$

$$Y=\sqrt{1+1}=1.41$$

$$Y=\sqrt{0+1}=1$$

CUADRO A-13. DATOS TRANSFORMADOS DE NUNERO DE MASAS DE HUEVOS DE *MELOIDOGYNE* POR PLANTA.

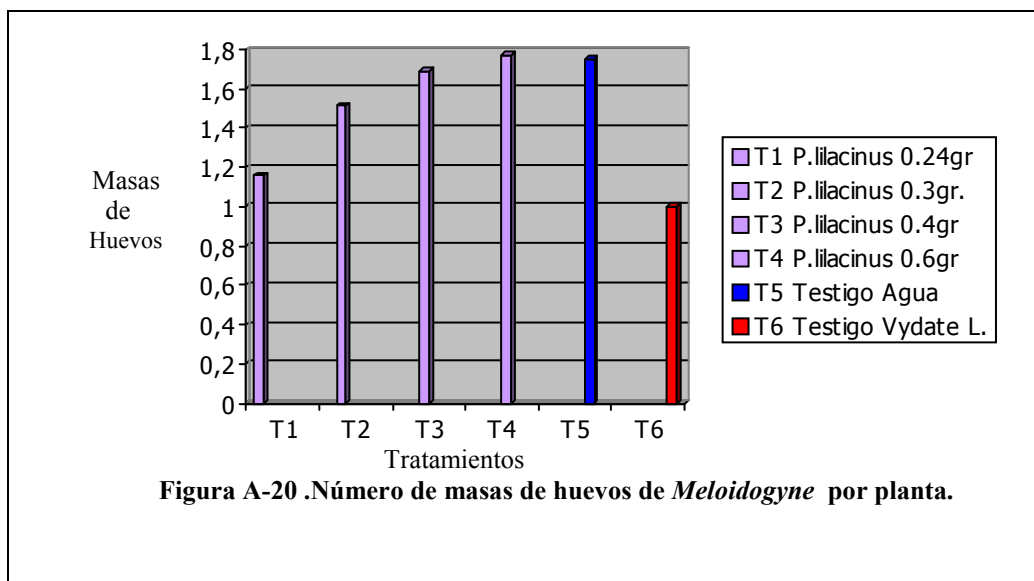
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAL (Y.i)	Media (Y.i)
T1	1	1	1	1	1	1.73	1.41	8.14	1.16
T2	1.73	1.73	1	2	1.41	1.73	1	10.6	1.51
T3	2.24	1	1.73	2	1	1.41	2.45	11.83	1.69
T4	2	1.41	2	1.41	1.73	2.45	1.41	12.41	1.77
T5	1.73	1.41	2.24	1	2.24	2.24	1.41	12.27	1.75
T6	1	1	1	1	1	1	--	6	1
TOTAL	9.7	7.55	8.97	8.41	8.38	10.56	7.68	61.25	8.88

CUADRO A-14. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE MASAS DE HUEVOS DE *MELOIDOGYNE* POR PLANTA.

F.de V.	G.L	S.C	C.M	FC	F Tablas	
					5%	1%
Tratamientos	5	4.84	0.97	5.10**	2.48	3.58
Error Experimental	36	6.77	0.19			
Total	41	11.61				

** Significativo al 5% y 1% de probabilidad.

Como "F" calculada es mayor que "F" tablas, los resultados son Significativos, lo que indica que existen diferencias entre las medias de los tratamientos, por lo que se concluye que la presencia de masas de huevos de *Meloidogyne* sp en las raíces de las plantas de cafeto fueron diferentes.



CUADRO A-15. NUMERO DE NEMATODOS EN 100 GRAMOS DE SUELO.

TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAL (Y.i)	Media (Y.i)
T1	2	1	0	1	0	0	1	5	
T2	2	2	0	0	0	1	0	5	
T3	1	0	1	1	0	0	2	5	
T4	1	0	0	0	0	0	0	1	
T5	1	1	1	0	0	0	0	3	
T6	0	0	0	0	0	0	--	0	
TOTAL									

Transformación de datos por medio de la “Transformación raíz cuadrática”

$$Y = \sqrt{X+1}$$

Transformando datos:

$$Y = \sqrt{2+1} = 1.73$$

$$Y = \sqrt{1+1} = 1.41$$

$$Y = \sqrt{0+1} = 1$$

CUADRO A-16. DATOS TRANSFORMADOS DE NÚMERO DE NEMATODOS EN 100 GRAMOS DE SUELO

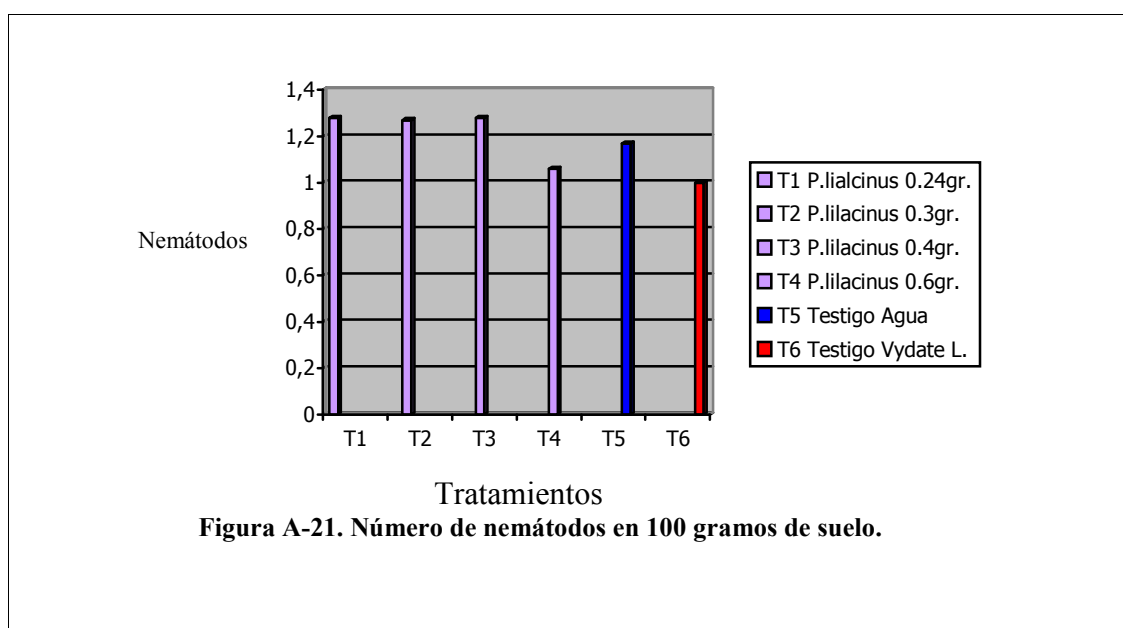
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAL (Y.i)	Media (Y.i)
T1	1.73	1.41	1	1.41	1	1	1.41	8.96	1.28
T2	1.73	1.73	1	1	1	1.41	1	8.87	1.27
T3	1.41	1	1.41	1.41	1	1	1.73	8.96	1.28
T4	1.41	1	1	1	1	1	1	7.41	1.06
T5	1.41	1.41	1.41	1	1	1	1	8.23	1.17
T6	1	1	1	1	1	1	--	6	1
TOTAL	8.69	7.55	6.82	6.82	6	6.41	6.14	48.43	7.06

CUADRO A-17. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE NEMATODOS EN 100 GRAMOS DE SUELO

F.de V	G.L	S.C	C.M	FC	FTablas	
					5%	1%
Tratamientos	5	1	0.2	2.5*	2.48	3.58
Error Experimental	36	3	0.08			
Total	41	4				

* Significativo al 5% de probabilidad.

Como "F" calculada es mayor que "F" tablas, los resultados son Significativos, lo que indica que existen diferencias entre las medias de los tratamientos, por lo que se concluye que hubo una mayor presencia de nematodos en algunas muestras de suelo de los tratamientos que en otros.



El cuadro A-18, presenta los resultados del estudio de parasitismo de *P.lilacinus* sobre *Meloidogyne* sp.

CUADRO A-18. NUMERO DE LARVAS ECLOSIONADAS POR REPETICIÓN Y POR TRATAMIENTO.

Días	*4 D.E		7 D.E		9 D.E		13 D.E	
	Número de nemátodos <i>Meloidogyne</i> sp.		Número de nemátodos <i>Meloidogyne</i> sp		Número de nemátodos <i>Meloidogyne</i> sp		Número de nemátodos <i>Meloidogyne</i> sp	
Pares	Testigo	<i>P.lilacinus</i>	Testigo	<i>P.lilacinus</i>	Testigo	<i>P.lilacinus</i>	Testigo	<i>P.lilacinus</i>
1	0	0	0	0	16	0	107	0
2	0	1	18	1	90	0	158	1
3	0	0	0	0	20	0	42	3
4	3	8	16	9	26	12	51	9
5	13	2	29	14	44	10	74	16
6	0	0	4	0	45	11	186	6
7	2	0	2	0	22	9	47	3
8	0	1	0	2	0	0	6	0
TOTAL	18	12	69	26	263	42	671	38

* D.E = Días de exposición.

Análisis del experimento con datos apareados.

Cuadro A-19. Primera toma de datos del experimento” Prueba de Parasitismo de *P. lilacinus* sobre *Meloidogyne* sp.”

4 D.E			
Par	Testigo	<i>P. lilacinus</i>	Diferencia (x.i)
1	0	0	0
2	0	1	-1
3	0	0	0
4	3	8	-5
5	13	2	11
6	0	0	0
7	2	0	2
8	0	1	-1
Total	18	12	6
Media	2.25	1.5	0.75

$$d = 6/8 = 0.75$$

$$S = 21.07$$

$$Sd = \sqrt{21.07/8} = 1.62$$

$$/tc/ = d/Sd = 0.75/1.62 = 0.46 \text{ N.S}$$

Limite de significación teórica (tabla de “t” de student).

$$G.L = (n-1) = 8-1 = 7$$

$$“t” \text{ Tablas} = 0.05 = 2.365$$

$$0.01 = 3.499$$

Conclusión: A los 4 días después de exposición el tratamiento de *P.lilacinus* comparado con el Testigo (agua), no presentan diferencias con respecto a la eclosión de larvas de *Meloidogyne* sp.

Cuadro A-20. Segunda toma de datos del experimento” Prueba de Parasitismo de *P. lilacinus* sobre *Meloidogyne* sp.”

7 D. E			
Par	Testigo	<i>P.lilacinus</i>	Diferencia (x.i)
1	0	0	0
2	18	1	17
3	0	0	0
4	16	9	7
5	29	14	15
6	4	0	4
7	2	0	2
8	0	2	-2
Total	69	26	43
Media	8.62	3.25	5.37

$$d = 43/8 = 5.37$$

$$S = 50.84$$

$$Sd = \sqrt{50.84/8} = 2.52$$

$$/tc/ = d/Sd = 5.37/2.52 = 2.13 \text{ N.S}$$

Limite de significación teórica (tabla de "t" de student).

$$G.L = (n-1) = 8-1 = 7$$

$$"t" \text{ Tablas} = 0.05 = 2.36$$

$$0.01 = 3.49$$

Conclusión: A los 7 días después de exposición el tratamiento de *P.lilacinus* comparado con el Testigo (agua), no presentan diferencias significativas con respecto a la eclosión de larvas de *Meloidogyne* sp.

Cuadro A-21. Tercera toma de datos del experimento "Prueba de Parasitismo de *P. lilacinus* sobre *Meloidogyne* sp."

9 D.E			
Par	Testigo	P.lilacinus	Diferencia (x.i)
1	16	0	16
2	90	0	90
3	20	0	20
4	26	12	14
5	44	10	34
6	45	11	34
7	22	9	13
8	0	0	0
Total	263	42	221
Media	32.87	5.25	27.62

$$d = 221/8 = 27.62$$

$$S = 761.125$$

$$Sd = \sqrt{761.125/8} = 9.75$$

$$/tc/ = d/Sd = 27.62/9.75 = 2.83 * \text{Significativo al } 5\%$$

Limite de significación teórica (tabla de "t" de student).

$$G.L = (n-1) = 8-1 = 7$$

$$"t" \text{ Tablas} = 0.05 = 2.365$$

$$0.01 = 3.499$$

Conclusión: A los 9 días después de exposición el tratamiento del Testigo (agua), presentan diferencias significativas con respecto al tratamiento de *P.lilacinus* en la eclosión de larvas de *Meloidogyne* sp.

Cuadro A- 22. Cuarta toma de datos del experimento "Prueba de Parasitismo de *P. lilacinus* sobre *Meloidogyne* sp."

13 D.E			
Par	Testigo	P.lilacinus	Diferencia (x.i)
1	107	0	107
2	158	1	157
3	42	3	39
4	51	9	42
5	74	16	58
6	186	6	180
7	47	3	44
8	6	0	6
Total	671	38	633
Media	83.87	4.75	79.125

$$d = 633/8 = 79.125$$

$$S = 3861.84$$

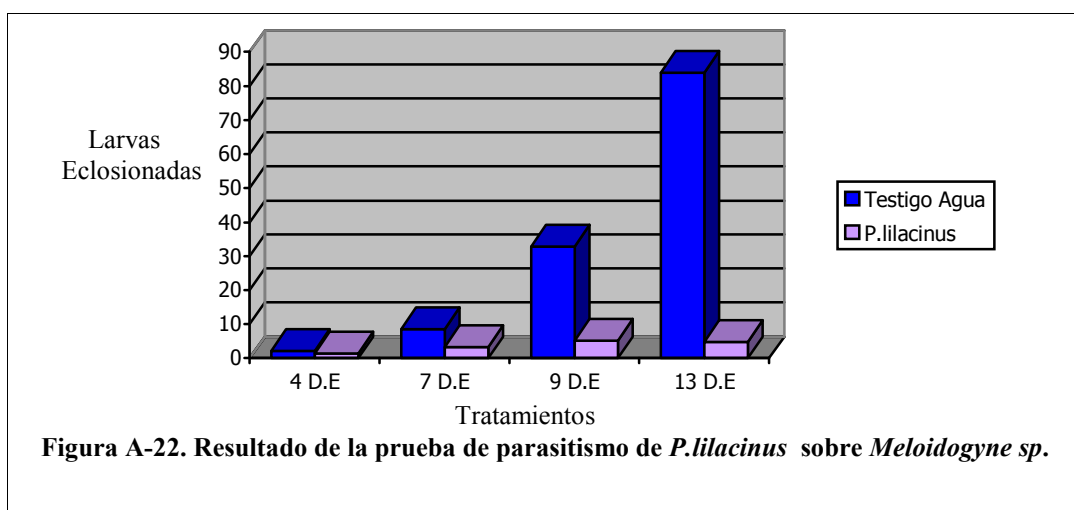
$$Sd = \sqrt{3861.84/8} = 21.97$$

$$/tc/ = d/Sd = 79.125/21.97 = 3.60 \text{ **Altamente Significativo al 5\% y 1\%}$$

Limite de significación teórica (tabla de "t" de student).

$$G.L = (n-1) = 8-1 = 7 \quad \text{"t"} \text{ Tablas} = 0.05 = 2.365 \quad \text{y} \quad 0.01 = 3.499$$

Conclusión: A los 13 días después de exposición el tratamiento del Testigo (agua), presentan diferencias muy significativas con respecto al tratamiento de *P.lilacinus* en la eclosión de larvas de *Meloidogyne* sp.



A-4. Control de Calidad del Producto PAZAM (*P.lilacinus*)

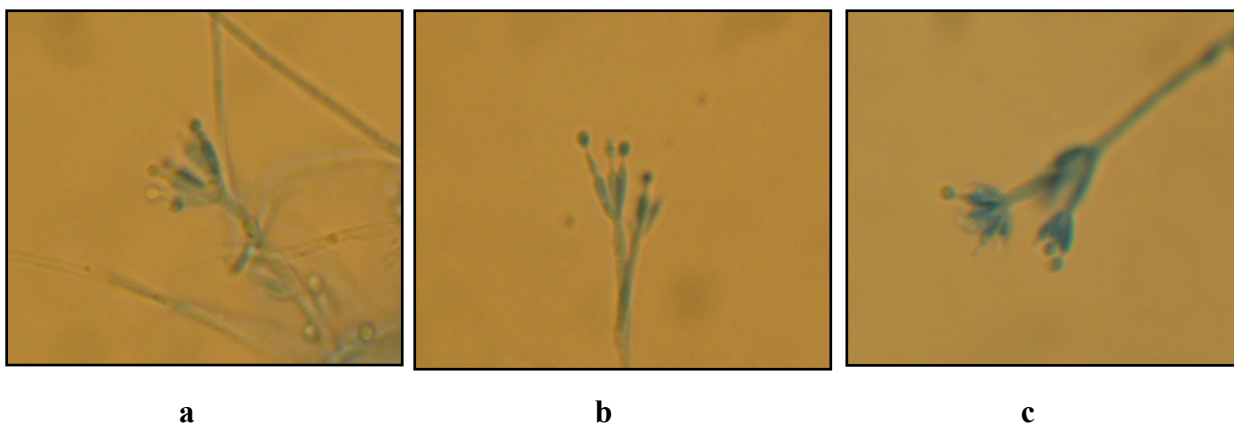
Después de una semana del aislamiento del hongo *P.lilacinus* en cajas petri conteniendo PDA, se comenzó a observar el crecimiento del micelio, el cual mostró diferentes tonalidades durante su desarrollo, iniciando con una coloración blanca, luego una grisácea y casi al final un rosado pálido que al cabo de mes y medio, a temperatura ambiente se torno aun morado lila bastante oscuro.



Figura A-23. Crecimiento de colonias del hongo *P.lilacinus*.

En las preparaciones microscópicas (laminillas), se observaron las estructuras o características típicas de *P. lilacinus* como los son Conidióforos, fiálidas y conidios las cuales se muestran en la figura A-24.

Al final se determino que el producto PAZAM estaba sin contaminación de *Fusarium spp.*, al no observarse la presencia de otras estructuras más que las de *P.lilacinus*, lo que indico que el producto estaba libre de contaminación.



a

b

c

Figura A- 24. a, b y c) Conidióforos, fiálidas y conidios, estructuras del hongo *Paecilomyces lilacinus* observadas al microscopio.