



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

## **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE LOS EXTRACTOS ACETÓNICO Y METANÓLICO DE (*Pleurotus ostreatus*)**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTOR: LOURDES ESTEFANÍA ALDAZ MERCHÁN**

**TUTOR: Dr. IVÁN RAMOS**

**Riobamba-Ecuador**

**2018**

**©2018, Lourdes Estefanía Aldaz Merchán**

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

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que la investigación “**Evaluación de la actividad nematocida de los extractos acetónico y metanólico de *Pleurotus ostreatus***”, de responsabilidad de la señorita Lourdes Estefanía Aldaz Merchán, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizado su presentación.

**NOMBRE:**

**FIRMA**

**FECHA**

Dr. Edgar Iván Ramos Sevilla

**DIRECTOR DE TRABAJO**

**DE TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dra. Jenny Marina Moreno Mora

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Yo, Lourdes Estefanía Aldaz Merchán soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Lourdes Estefanía Aldaz Merchán

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Lourdes Estefanía Aldaz Merchán declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

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

Riobamba, Abril 2018

Lourdes Estefanía Aldaz Merchán

060394353-1

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Dios, quien ilumina y guía cada día de mi existencia.

Dedico este trabajo todos los miembros de mi familia, que me han alentado de diferentes maneras a lo largo de mi vida, en especial a mi madre y hermano quienes con su amor, y consejos han sido mí apoyo incondicional para alcanzar a culminar con mi carrera profesional.

Estefanía Aldaz

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por su protección durante este arduo camino lleno de obstáculos y dificultades.

Agradezco infinitamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a planta docente de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental, por brindarme el apoyo y conocimiento necesario, para mi formación integral como profesional, de una manera especial, agradezco al Dr. Iván Ramos, y a la Dra. Jenny Moreno por la ayuda prestada para la realización de este trabajo de titulación.

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional, por los consejos diarios, por la confianza que han depositado en mí, y en este gran paso profesional.

Gracias mamita por estar siempre conmigo.

Estefanía Aldaz

## TABLA DE CONTENIDOS

|  |      |
|--|------|
| PORTADA.....                               | i    |
| DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....           | v    |
| DEDICATORIA.....                           | vi   |
| AGRADECIMIENTOS.....                       | vii  |
| RESUMEN.....                               | viii |
| ABSTRACT.....                              | ix   |
| TABLA DE CONTENIDO.....                    | xi   |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                     | xiv  |
| ÍNDICE DE TABLAS.....                      | xv   |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS.....                    | xvi  |
| <b>CAPÍTULO I</b>                          |      |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                     |      |
| 1.1. Identificación del problema.....      | 1    |
| 1.2. Justificación.....                    | 2    |
| 1.3. Objetivos.....                        | 3    |
| 1.3.1. Objetivo general.....               | 3    |
| 1.3.2. Objetivos específicos.....          | 3    |
| <b>CAPÍTULO II</b>                         |      |
| <b>2. MARCO TEÓRICO</b>                    |      |
| 2.1. Antecedentes de la Investigación..... | 4    |
| 2.2. Bases Teóricas.....                   | 5    |
| 2.2.1. <i>Control biológico</i> .....      | 5    |
| 2.2.2. <i>Hongos entomopatógenos</i> ..... | 5    |
| 2.2.3. <i>Hongos nematófagos</i> .....     | 6    |



|  |     |
|--|-----|
| 2.2.3.1. Hongos atrapadores de nemátodos.....                      | 6   |
| 2.2.3.2. Hongos endoparásitos.....                                 | 7   |
| 2.2.3.3. Hongos parásitos de huevos.....                           | 7   |
| 2.2.3.4. Hongos productores de toxinas.....                        | 8   |
| 2.2.4. <i>Pleurotus ostreatus</i> .....                            | 8   |
| 2.2.5. Acción nematicida del <i>Pleurotus</i> .....                | 10  |
| 2.2.6. Nemátodos .....   | 10  |
| 2.2.7. Género <i>Ditylenchus dipsaci</i> .....                     | 11  |
| 2.2.8. Género <i>Panagrellus redivivus</i> .....                   | 13  |
| 2.2.9. Control de nemátodos fitoparásitos .....                    | 13  |
| 2.2.10. Obtención de extractos vegetales .....                     | 14  |
| 2.2.10.1. Método soxhlet. ....                                     | 15  |
| <b>CAPÍTULO III</b>  |     |
| <b>3. MARCO METODOLÓGICO</b>                                       |     |
| 3.1. Hipótesis.....  | 16  |
| 3.1.1. Hipótesis General.....                                      | 16  |
| 3.1.2. Hipótesis Específicas.....                                  | 16  |
| 3.2. Variables .....   | 16  |
| 3.2.1. Variable Dependiente.....                                   | 16  |
| 3.2.2. Variables Independientes.....                               | 16  |
| 3.3. Tipo de investigación.....                                    | 16  |
| 3.4. Diseño de la investigación .....                              | 177 |
| 3.5. Unidad de análisis .....                                      | 18  |
| 3.6. Etapas de la investigación.....                               | 18  |
| 3.6.1. Materiales equipos y reactivos .....                        | 18  |
| 3.6.2. Obtención de la biomasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> ..... | 19  |
| 3.6.2.1. Producción de semilla.....                                | 19  |
| 3.6.2.2. Obtención de la semilla o inóculo.....                    | 20  |

|  |    |
|--|----|
| 3.6.2.3. <i>Incubación</i> .....   | 20 |
| 3.6.2.4. <i>Fructificación</i> .....   | 21 |
| 3.6.2.5. <i>Cosecha</i> .....  | 21 |
| 3.6.3. <i>Preparación de la muestra</i> .....  | 21 |
| 3.6.4. <i>Obtención de los extractos</i> .....   | 22 |
| 3.6.5. <i>Obtención de nemátodo Panagrellus redivivus</i> .....  | 23 |
| 3.6.6. <i>Obtención del nemátodo Ditylenchus dipsaci</i> .....   | 24 |
| 3.6.7. <i>Determinación in vitro de la actividad nematicida</i> .....  | 25 |
| <b>CAPÍTULO IV</b>   |    |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   |    |
| 4.1. <b>Análisis de la varianza</b> .....  | 26 |
| 4.1.1. <i>Mortalidad de los nemátodos por la acción de los extractos metanólico y acetónico del Pleurotus ostreatus en las diferentes concentraciones.</i> ..... | 26 |
| 4.1.2. <i>Mortalidad de las dos especies de nemátodos por la acción del extracto metanólico y acetónico</i> .....  | 27 |
| 4.1.3. <i>Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nemátodos por las diferentes concentraciones de los extractos del Pleurotus ostreatus</i> .....        | 28 |
| 4.1.4. <i>Porcentaje de mortalidad de los nemátodos en la interacción extractos – concentración</i> .....  | 29 |
| 4.1.5. <i>Porcentaje de mortalidad de los nemátodos en la interacción extracto – nemátodo</i> .....  | 31 |
| 4.1.6. <i>Porcentaje de mortalidad de los nemátodos en la interacción concentración de nemátodo.</i> .....   | 32 |
| 4.1.7. <i>Porcentaje de mortalidad de los nemátodos en la interacción extracto - concentración de nemátodo</i> .....   | 34 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....  | 36 |
| <b>RECOMENDACIONES</b> .....   | 37 |
| <b>GLOSARIO</b> .....  | 38 |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>  |    |
| <b>ANEXOS</b>  |    |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1-2:</b> Hongo formador de anillos de constricción.....                                | 6  |
| <b>Figura 2-2:</b> Hongo del género <i>Pochonia</i> , hongo parásito de huevos de nemátodos..... | 7  |
| <b>Figura 3-2:</b> Hifas del hongo <i>Pleurotus</i> ingresando por la boca del nemátodo.....     | 8  |
| <b>Figura 4-2:</b> Hongo <i>P. ostreatus</i> .....   | 9  |
| <b>Figura 5-2:</b> Morfología general de nemátodos.....  | 11 |
| <b>Figura 6-2:</b> Morfología de <i>Ditylenchus dipsaci</i> .....                                | 12 |
| <b>Figura 7-2:</b> Pareja de <i>Panagrellus redivivus</i> .....                                  | 13 |
| <b>Figura 1-3:</b> Inóculo de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....                                   | 19 |
| <b>Figura 2-3:</b> Frascos invadidos con <i>P. ostreatus</i> .....                               | 20 |
| <b>Figura 3-3:</b> Incubación hongo <i>P. ostreatus</i> .....                                    | 21 |
| <b>Figura 4-3:</b> Deshidratación cacera de hongo <i>P. ostreatus</i> .....                      | 22 |
| <b>Figura 5-3:</b> Equipo soxhlet.....   | 22 |
| <b>Figura 6-3:</b> Equipo soxhlet utilizado.....   | 23 |
| <b>Figura 7-3:</b> Paredes de recipiente con <i>P. redivivus</i> .....                           | 23 |
| <b>Figura 8-3:</b> Observación de <i>P. redivivus</i> en el estereoscopio.....                   | 24 |
| <b>Figura 9-3:</b> Embudo Baermann con muestras de suelo.....                                    | 24 |
| <b>Figura 10-3:</b> Nemátodos en la caja petri.....  | 25 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1-2:</b> Taxonomía de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....   | 8  |
| <b>Tabla 2-2:</b> Composición del <i>Pleurotus ostreatus</i> .....  | 10 |
| <b>Tabla 3-2:</b> Morfología del <i>Ditylenchus dipsaci</i> .....   | 11 |
| <b>Tabla 1-3:</b> Diseño trifactorial.....  | 17 |
| <b>Tabla 1-4:</b> Cuadro de Análisis de la Varianza para porcentaje de mortalidad.....  | 26 |
| <b>Tabla 2-4:</b> Prueba de DMS al 5% para porcentaje de mortalidad en extracto.....  | 27 |
| <b>Tabla 3-4:</b> Prueba de DMS al 5% para porcentaje de mortalidad en nemátodos.....   | 28 |
| <b>Tabla 4-4:</b> Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de mortalidad en concentración.....                                       | 29 |
| <b>Tabla 5-4:</b> Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de mortalidad en la interacción extracto concentración.....               | 29 |
| <b>Tabla 4-6:</b> Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de mortalidad en la interacción extracto nemátodo.....                    | 31 |
| <b>Tabla 7-4</b> Prueba de Tukey al 5% para para porcentaje de mortalidad en la interacción concentración nemátodo.....           | 33 |
| <b>Tabla 8-4:</b> Prueba de Tukey al 5% para para porcentaje de mortalidad en la interacción extracto concentración nemátodo..... | 32 |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

|   |    |
|---|----|
| <b>Gráfico 1-4:</b> Interacción extracto concentración. ....                      | 30 |
| <b>Gráfico 2-4:</b> Mortalidad de nemátodos según el extracto. ....               | 32 |
| <b>Gráfico 3-4:</b> Mortalidad del nemátodo según la concentración utilizada..... | 33 |

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>°C</b>            | Grados Celsius  |
| <b>CM</b>            | Cuadrados medios  |
| <b>C.V.</b>          | Coefficiente de varianza  |
| <b>D – D</b>         | Dicloropropano - dicloropropeno   |
| <b>D. dipsaci</b>    | Ditylenchus dipsaci   |
| <b>DMS</b>           | Diferencia mínima significativa   |
| <b>F</b>             | Frecuencia  |
| <b>FAO</b>           | Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura |
| <b>g</b>             | Gramos  |
| <b>g/l</b>           | Gramos/Litro  |
| <b>h</b>             | Horas   |
| <b>H<sub>0</sub></b> | Hipótesis nula  |
| <b>H<sub>1</sub></b> | Hipótesis alternativa   |
| <b>INIAP</b>         | Instituto Nacional Autónomo de investigaciones agropecuarias              |
| <b>mL</b>            | Mililitros  |
| <b>mm</b>            | Milímetros  |

|                            |                              |
|----------------------------|------------------------------|
| <b>PCP</b>                 | Fenciclidina                 |
| <b><i>P. ostreatus</i></b> | <i>Pleurotus ostreatus</i>   |
| <b><i>P. redivivus</i></b> | <i>Panagrellus redivivus</i> |
| <b>P-valor</b>             | Nivel de significancia       |
| <b>SC</b>                  | Suma de cuadrados            |
| <b>WA</b>                  | Agar Agua                    |
| <b>%</b>                   | porcentaje                   |

## RESUMEN

En esta investigación se busca comprobar que el hongo *Pleurotus ostreatus*, tiene actividad nematicida, como primer paso se obtuvo el extracto, en los solventes acetona y metanol, mediante el método de extracción soxhlet, el cual permite obtener el extracto de un sólido, con la ayuda de un solvente en fase líquida, que según bibliografía contiene el ácido trans-2-decenedioico, responsable de matar a los nemátodos con el simple contacto, las especies de nemátodos que se utilizaron en los ensayos fueron: nemátodo *D. dipsaci* que se recolectó de varias muestras de suelo de cultivo de cebolla colorada *Allium cepa*, mediante el método del embudo Baermann, y el nemátodo *Panagrellus redivivus* se obtuvo de la replicación de un cultivo masivo del microgusano. El ensayo se basa en la aplicación del extracto a concentraciones (25, 50, y 75%), en una cantidad determinada de nemátodos, durante una hora, logrando así determinar, el índice de mortalidad. Mediante un análisis de diferencias medias significativas (dms) y una prueba tukey, con nivel de significancia 0,05, se identifica que el mejor resultado se obtiene con la aplicación del extracto acetónico a un 75% de concentración, presentando un índice de mortalidad de 95% para matar al nemátodo *Ditylenchus dipsaci*, y para *Panagrellus redivivus* a la misma concentración 92.55% de mortalidad. Mientras que con la aplicación del extracto metanólico a la misma concentración, la mortandad de los nemátodos disminuye a 84,98 y 80,75% respectivamente.

**Palabras clave:** <BIOTECNOLOGÍA>, <BIOCONTROL>, <NEMATICIDA>, <BIONEMATICIDA>, <HONGO OSTRA (*Pleurotus ostreatus*)>, <NEMÁTODO (*Panagrellus redivivus*)>, <NEMÁTODO (*Ditylenchus dipsaci*)>.



## ABSTRACT

This study aims to demonstrate the nematicide action of the fungus *Pleurotus ostreatus*. The first stage in this process was to get an extract in acetone and methanol solvents by conducting the Soxhelt extraction method, which enables to get an extract coming from a solid combined with a solvent in a liquid phase. According to bibliographical sources, the composition of this extract contains the trans-2-decenedioic acid, which is responsible of eliminating the nematodes only with simple contact. The *D. dipsaci* nematode was the first of the nematodes species to be analyzed in the tests. This nematode came from samples collected from the soil of several red Onion (*Allium cepa*) crops by means of the Baermann funnel method. Then, the *Panagrellus redivivus* was the second species of nematode coming from the replication of a mass culture of the roundworms. The test was based on the application of the extract at concentrations (25, 50, and 75%), in a determined amount of nematodes during one hour thus, determining, the index of mortality. The analysis of significant mean differences (smd), and a Tukey test with a level of significance of 0,05, were the statistical procedures to determine that the best result was obtained with the application of the acetone extract at a concentration of 75%, showing a mortality rate of 95% to eradicate the *Ditylenchus dipsaci* nematode. This concentration was applied for *Panagrellus redivivus* reporting a 92.55% of mortality while with the application of the 75% of methanolic, extract the mortality rate of the nematodes decreases to 84.98 and 80.75% respectively, it is recommended to enable the extract collection since the production time is very long.

**Keywords:** <EXACT AND NATURAL SCIENCES>, <BIOTECHNOLOGY>, <BIOCONTROL>, <NEMATICIDE>, <BIONEMATICIDE>, <OYSTER FUNGUS (*Pleurotus ostreatus*)>, <NEMATODE (*Panagrellus redivivus*)>, <NEMATODE (*Ditylenchus dipsaci*)>

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Identificación del problema

La producción agrícola en los últimos años se ha visto afectada y amenazada por los nemátodos, microorganismos que miden aproximadamente 0,2 milímetros y se desarrollan habitualmente en la tierra, son difíciles de identificar su existencia, la misma que se la puede realizar a través de un análisis metódico en el laboratorio, el mecanismo de invasión de estos microorganismos es mediante la formación de nódulos en las raíces de las plantas. Actualmente, para controlar este tipo de plaga se utilizan organofosforados de origen químico, sin embargo debido a su uso excesivo e inadecuado estos causan daños en la salud de los trabajadores agrícolas y además contaminan el suelo, el agua el aire, por cuanto tienen características tóxicas.

En el Ecuador los agricultores utilizan en forma indiscriminada productos químicos para mejorar su producción, esta actividad sin embargo ocasiona los daños en la estructura del suelo, haciéndoles más susceptibles al ataque de diferentes plagas, y, entre la más común esta la causada por los nemátodos especialmente en cultivos de leguminosas, hortalizas y frutales. El control de estos microorganismos es indispensable, en esa consideración, actualmente se están investigando alternativas biológicas que permitan contrarrestar la acción plaguicida de los nemátodos. Estudios realizados por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), demuestran que el uso de hongos antagonistas, pueden ayudar a reducir las poblaciones de nemátodos.

Una de las técnicas de biocontrol de mayor interés para controlar esta infección, es el uso de hongos nematófagos y entre los más importantes está el *Pleurotus ostreatus*, el cual ataca a los nemátodos con la particularidad de que no causa contaminación ambiental y por sobre todo no representa un riesgo para la salud del agricultor.

Barron en 1986 demostró que el hongo *P. ostreatus*, puede combatir a los nemátodos, porque este en su metabolismo secreta una toxina en todas las fases de su crecimiento, la misma que tiene la capacidad de matar a estos microorganismos inclusive al mínimo contacto. La extracción de estos metabolitos secundarios que causan el efecto de inmovilización del nemátodo, genera beneficios

ambientales y económicos para los productores y a su vez el desarrollo de nuevas técnicas de control biológico.

En la presente investigación se pretende comprobar la acción nematicida de los extractos acetónico y metanólico obtenidos del hongo *Pleurotus ostreatus*.

## **1.2. Justificación**

Las actividades agrícolas constituyen una de las principales causas de contaminación ambiental, en sus diferentes etapas, como son el uso de sustancias para controlar la acción de plagas y la generación de sub productos al final del proceso. Actualmente se buscan alternativas agrícolas que sean benéficas con el ambiente y con la seguridad alimentaria de la población. Uno de los problemas que afecta a las actividades agrícolas y que arrasa con cultivos ocasionando pérdidas económicas cuantiosas es la presencia de los nemátodos, para controlar la presencia de estos microorganismos los agricultores se ven obligados a utilizar nematicidas químicos los mismos que tienden a bioacumularse, generan resistencia por parte de las plagas cuando son usados sin un adecuado control, tienen un alto costo y ocasionan afecciones en la salud del productor y del consumidor. Por esta razón es necesario buscar otras alternativas de control de los nemátodos entre las cuales se encuentra el control biológico

El control biológico, se define como el uso de organismos benéficos, para combatir a aquellos que causan daño, con la aplicación de esta técnica se evita, la interrupción de ciclo biológicos, aparición de plagas resistentes, daños ambientales, además la relación coste/beneficio es favorable, y su aplicación es sencilla.

El biocontrol mediante el uso de hongos constituye una excelente alternativa para controlar la acción de los nemátodos. Diversos estudios realizados, han permitido hacer diferentes clasificaciones de los agentes de control, identificando así a los hongos nematófagos y hongos endófitos (Mejia, 2015). El *Pleurotus ostreatus* a más de ser un hongo descomponedor de madera, posee características nematicidas, es decir, las hifas de este organismo contienen toxinas, las cuales al ponerse en contacto con el nemátodo, lo inmovilizan e invaden al microorganismo. (Lopez Llorca, y otros, 2001).

En la presente investigación se utilizará los extractos acetónico y metanólico obtenidos del hongo *Pleurotus ostreatus*, para determinar su actividad nematicida, como una alternativa de control biológico.

### **1.3. Objetivos**

#### ***1.3.1. Objetivo general***

Evaluar la actividad nematocida de los extractos acetónico y metanólico del *Pleurotus ostreatus*.

#### ***1.3.2. Objetivos específicos***

- Determinar in vitro la mejor concentración de extracto para combatir al nemátodo fitoparásito *Panagrellus redivivus* y *Ditylenchus dipsaci*.
- Comprobar la actividad nematocida del extracto metanólico
- Comprobar la actividad nematocida del extracto acetónico
- Comparar la eficacia de la actividad nematocida de los dos extractos obtenidos.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la Investigación

En los últimos años, los daños ambientales causados por la utilización de productos químicos para aumentar la producción agrícola y la rotación limitada de cultivos, han incentivado el desarrollo de agentes de control biológico como un componente de protección de cultivos y del ambiente. El control biológico constituye una estrategia clave que se utiliza para el control de plagas en todo el mundo. Mohammad define el control biológico como el uso de organismos vivos para suprimir la densidad de población o el impacto de una plaga, lo que es menos perjudicial de lo que sería el uso de los agroquímicos. (Mohammad , y otros, 2011)

Estudios realizados por Lopez Llorca, manifiestan que en 1888 se utilizó el hongo *Arthrobotrys oligospora* para controlar nemátodos, y se lo clasifica dentro del grupo de los hongos nematófagos. Actualmente se conocen varias especies de basidiomicetos que pueden, capturan y consumir nemátodos como fuente complementaria de nitrógeno para su crecimiento. (Thorn y Barrom 1984)

Thorn y Barrom en el año 1987, demostraron que la muerte de los nemátodos es causada por la toxina contenida en las hifas del *P. ostreatus*, las cuales al entrar en contacto con el microorganismo invaden rápidamente su cuerpo y que, al cabo de 30 segundos la toxina inmoviliza a los nemátodos.

Ensayos realizados por Kwok en el año 1991, demuestran que la toxina del *Pleurotus ostreatus* denominada NRL 3526 cuando es aplicada a una concentración de 300 ppm, inmoviliza el 95% de nemátodos *Panagrellus redivivus* al cabo de una hora. La toxina fue identificada como el ácido trans-2-decenedioico.

Pruebas *in vitro*, realizadas por Mamiya *et al.* (2005) reportan que los hongos como *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, tienen la habilidad de inmovilizar y matar nemátodos *Bursaphelenchus xylophilus*. Por su parte Heydari *et al.* (2006), evaluó el efecto antagonista de 5 especies de *Pleurotus* con *Meloidogyne javanica in vitro*, y los resultados determinan que todas

las especies produjeron pequeñas gotas de toxina que inmovilizaban rápidamente a los nemátodos.

Investigaciones in vitro realizadas por Víctor Manuel Pérez en el año 2014, demuestran que al colocar los nemátodos al borde de una colonia de *Pleurotus ostreatus*, las gotas generan una intoxicación de los mismos y se evidencia esto porque la región de la cabeza de los nemátodos, que normalmente tiene forma cónica, parece hincharse considerablemente

Estudios publicados en (Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*, 2011) demuestran que las hifas de *Pleurotus ostreatus*, al crecer en la superficie del medio de cultivo, producen células secretoras de toxinas diminutas a lo largo de la longitud de las hifas más antiguas y casi nada en las jóvenes.

## **2.2. Bases Teóricas**

### **2.2.1. Control biológico**

El control biológico es la técnica utilizada como alternativa para combatir plagas, este método ecológico utiliza organismos vivos (sus metabolitos o subproductos), para reducir o eliminar las poblaciones de plagas, insectos y patógenos de los cultivos. Se aprovecha las relaciones antagonistas entre hongos, bacterias, virus y los agentes causantes de las enfermedades de los vegetales. (Lozano, 2015)

Los hongos son los organismos más utilizados para el control biológico, los cuales presentan diversos mecanismos de ataque, entre los cuales se destacan los hongos entomopatógenos y los nematófagos

### **2.2.2. Hongos entomopatógenos**

Son hongos capaces de eliminar o controlar la cantidad de plagas de los cultivos. Se los puede encontrar en rastrojos de cultivos, suelo, plantas, estiércol, etc. Son considerados como el grupo de mayor importancia para el control de insectos. Se han estudiado aproximadamente 100 géneros y 700 especies de estos hongos. Para su aplicación se necesita de una extensa investigación sobre su fisiología, genética, patología, ecología, producción masiva, etc.

### 2.2.3. *Hongos nematófagos*

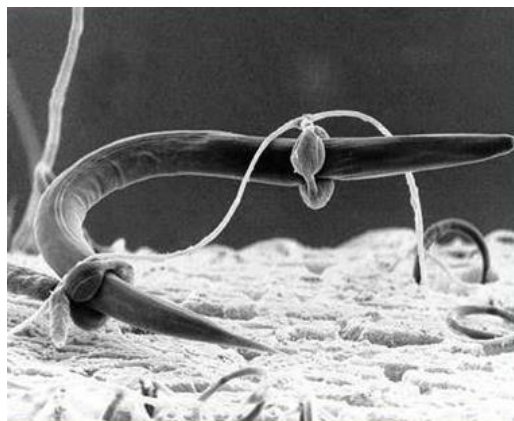
Son hongos capaces de matar y digerir nemátodos, en huevos, juveniles o adultos, son saprófitos, existen más de 300 especies de hongos nematófagos. La mayoría se desarrollan en el suelo, en las raíces de las plantas. Estos hongos según el modo de infección se clasifican en:

- Hongos atrapadores de nemátodos
- Hongos endoparásitos
- Hongos parásitos de huevos
- Hongos productores de toxinas

#### 2.2.3.1. *Hongos atrapadores de nemátodos*

Conocidos también como hongos depredadores, son verdaderos hongos carnívoros tienen diversos mecanismos para capturar a su presa, algunos secretan sustancias pegajosas, así atrapan a pequeños insectos, protistas, e incluso a otros hongos. (Curtis, 2008)

El mecanismo desarrollado por estos hongos se puede observar en (Figura 1-2), en donde se muestra que el ataque a los pequeños organismos consiste en generar esporas adhesivas o anillos de constricción, el hongo va a penetrar la cutícula del microorganismo, formando un bulbo de infección, las hifas crecen dentro del cuerpo y digieren al nemátodo. La desventaja de la utilización de estos hongos es la falta de selectividad, ya que no atacan solo a los nemátodos fitopatógenos, sino también a otros organismos benéficos del suelo. Una de las especies que utilizan estos mecanismos es el *Arthrobotrys*. (Perez, 2014)



**Figura 1-2:** Hongo formador de anillos de constricción.  
**Fuente:** (Lopez Llorca, y otros, 2001)

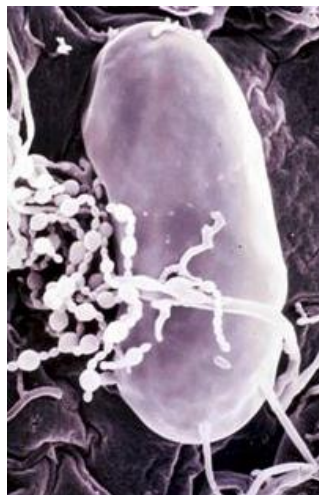
### 2.2.3.2. Hongos endoparásitos

La actividad de estos hongos, consiste en la proliferación de esporas, que al ser ingeridas por el microgusano germinan, y perforan la cutícula del gusano. La aplicación es limitada ya que solo son activos en los estados parasitarios larvarios 1 y 2, mientras que el estado larvario 3 presenta una cutícula doble. (Sagüés, 2012)

Los hongos representativos son *Hirsutella rhossiliensis*, mediante estudios se ha comprobado que esta especie es capaz de disminuir considerablemente la invasión del nemátodo *Meloidogyne javanica*, *Terodera avenae*, *H. glycines* y *Criconeema xenoplax*

### 2.2.3.3. Hongos parásitos de huevos

Estos hongos saprofitos son ampliamente utilizados para el control biológico de nemátodos fitopatógenos, atacan a los quistes que contienen los huevos de los microorganismos, se ha logrado determinar dos diferentes métodos de infección; uno es a través de la penetración de la hifa del hongo en la cascara del huevo, y el otro con la formación de un órgano llamado apresorio o zoosporas, este se forma en el sitio de contacto de la hifa con la cascara del huevo, como se puede observar en la (Figura 2-2). Las especies de hongos que tienen estas características son *Pochonia*, *Paecilomyces*, *Haptocillium* e *Hirsutella*. Son agentes muy efectivos para el control biológico de *Meloidogyne spp.* y *Tylenchulus semipenetrans*. (Figura 2-6)

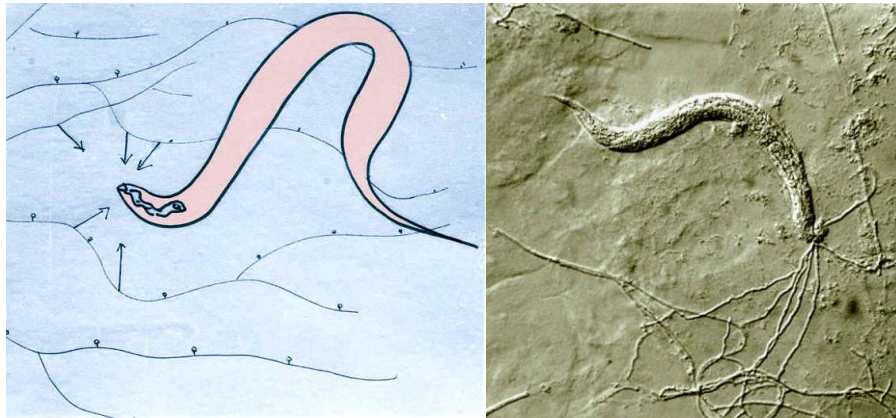


**Figura 2-2:** Hongo del genero *Pochonia*, hongo parásito de huevos de nemátodos.  
Fuente: (Kwok, y otros, 1991)



#### 2.2.3.4. Hongos productores de toxinas

Estos hongos tienen la capacidad de secretar metabolitos secundarios, cuando el hongo es sometido a condiciones físicas de estrés por ejemplo a variaciones de temperatura y luminosidad, como se puede observar en la (Figura 3-2) entre los hongos de mayor importancia que producen estas toxinas con actividad nematocida están el *Pleurotus ostreatus*, y *Catenaria anguillulae*. (Lopez Llorca, y otros, 2001)



**Figura 3-2:** Hifas del hongo *Pleurotus* ingresando por la boca del nemátodo  
Fuente: (Kwok, y otros, 1991)

#### 2.2.4. *Pleurotus ostreatus*

La clasificación taxonómica del *Pleurotus ostreatus* se evidencia en la tabla 1-2.

**Tabla 1-2:** Taxonomía de *Pleurotus ostreatus*

|                           |                            |
|---------------------------|----------------------------|
| <b>Reino:</b>             | Fungi                      |
| <b>Subreino:</b>          | Fungi                      |
| <b>Superior división:</b> | Basidiomycota              |
| <b>Superclase:</b>        | Hymenomycetes              |
| <b>Orden:</b>             | Agaricales                 |
| <b>Familia:</b>           | Tricholomataceae           |
| <b>Género:</b>            | Pleurotus                  |
| <b>Especie:</b>           | <i>Pleurotus ostreatus</i> |

Fuente: (Curtis, 2008)

Los hongos del género *Pleurotus* son de gran importancia económica, debido a que sus cuerpos fructíferos tienen una amplia aceptación en el campo alimenticio debido a su agradable y exquisito sabor. El consumo alimenticio de este hongo inició en el año de 1800 en Asia, 100 años después fue cultivado en Estados Unidos, y posteriormente introducido en Europa y la India. (Figura 4-2).



**Figura 4-2:** Hongo *P. ostreatus*.  
**Fuente:** (Senasica, 2015)

Este hongo se caracteriza por degradar materia viva o muerta que contenga celulosa, hemicelulosa y lignina como la paja de trigo, pulpa de café, astillas de madera dura y blanda, aserrín, cascarilla de arroz, hojas y mazorcas de maíz, bagazo de caña de azúcar, cascara de cacao, etc., también crece en condiciones silvestres en troncos y ramas muertas. Para el cultivo de este hongo es necesario mantener la humedad al 70% en el sustrato, en muchos casos es enriquecido con proteínas como alfalfa o harina de soya, esta mezcla se coloca en fundas, cajones o armazones adecuados para su desarrollo. Las condiciones climáticas adecuadas se las puede lograr artificialmente, y así obtener buen rendimiento de los esporóforos,

El hongo *Pleurotus ostreatus* es resistente a plagas y enfermedades, la composición química del mismo es variable y depende de su etapa de desarrollo, está compuesto de grandes cantidades de aminoácidos esenciales, excepto de triptófano, contiene proteína con estructura similar a la de origen animal, vitaminas como tiamina B<sub>1</sub>, riboflavina B<sub>2</sub>, piridoxina B<sub>6</sub> y cobalamina B<sub>12</sub>, es una fuente importante de calcio y fósforo. Además contiene minerales, lípidos y carbohidratos en diferentes concentraciones como se indica en la (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2:** Composición del *Pleurotus ostreatus*

| Elemento      | Porcentaje |
|---------------|------------|
| Minerales     | 7%         |
| Fibra cruda   | 14%        |
| Lípidos       | 3-5%       |
| Carbohidratos | 57%        |

Fuente: (Curtis, 2008)

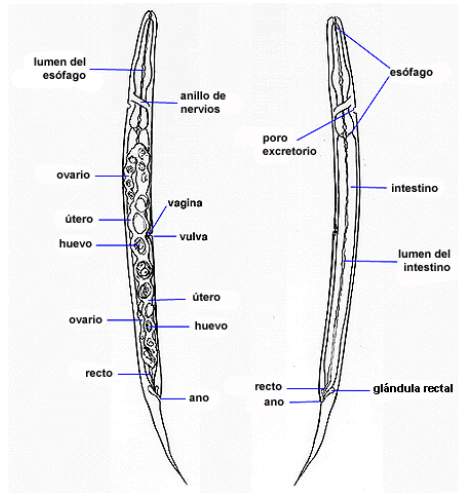
### 2.2.5. Acción nematocida del *Pleurotus*

Las especies del genero *Pleurotus* son caracterizadas por atacar a los nemátodos y entre las principales se encuentra el *Pleurotus ostreatus*, este hongo produce hifas las cuales generan gotas de toxina, que al entrar en contacto con los nemátodos inactivan a los mismos, contrayendo su cabeza, posteriormente las hifas del hongo invaden al microorganismo, y lo digieren en un periodo de 2 a 3 días. La capacidad nematocida varía según la especie del hongo. (Sierra Monroy, 2014).

### 2.2.6. Nemátodos

El término nemátodo proviene del griego (*Nema* = hilo, *Oidos* = con aspecto de), es decir son gusanos con aspecto de hilos, son parásitos que se desarrollan libremente en la naturaleza o dentro de invertebrados, vertebrados, y plantas, están ampliamente distribuidos en cualquier nicho ecológico con alto contenido de agua, su hábitat es esencialmente acuático, su cuerpo es cilíndrico, alargado y cubierto por una cutícula quitinosa, en algunos casos estriados, presentan simetría bilateral, sus tamaños son diversos, que van desde los 0,3mm hasta los 8 mm.de longitud. (Esquivel, 2014)

Poseen todos los sistemas orgánicos, excepto el respiratorio y circulatorio. Normalmente el ciclo de vida de los nemátodos es directo o monoxenico, sin embargo otros poseen un ciclo de vida indirecto o heteroxenico, en la (Figura 5-2) se puede observar la morfología de estos microorganismos.



**Figura 5-2:** Morfología general de nemátodos  
**Fuente:** (Andres, 2002)

Entre los nemátodos fitoparásitos se distinguen dos especies diferentes, los ectoparásitos que son los que se desarrollan en los pelos radicales y en las células epidérmicas de la raíz, como el *Tylenchus*, y otros que se encuentran en las células profundas de los tejidos y transmiten virus, como el *Londigorus* y *Xiphinema*; otro grupo de nemátodos son los endoparásitos, que se clasifican en sedentarios, generalmente esférico como el *Heterodera* y *Meloidogyne*, y los móviles como el *Pratylenchus* y *Ditylenchus*. (Andres, 2002)

### 2.2.7. Género *Ditylenchus dipsaci*

La clasificación taxonómica de este hongo basada en la morfología de adultos se detalla en la tabla 3-2:

**Tabla 3-2:** Morfología del *Ditylenchus dipsaci*

**Phylum:** Nemata

**Clase:** Secernentea

**Subclase:** Diplogasteria

**Superfamilia:** Tylenchina

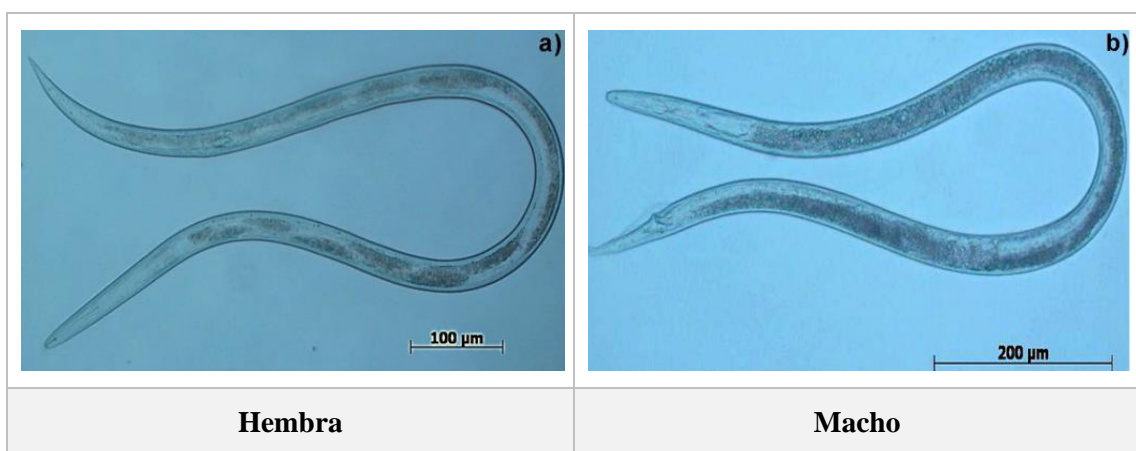
**Familia:** Anguininae

**Género:** *Ditylenchus*

**Especie:** *Dipsaci sensu stricto*

**Fuente:** (Senasica, 2015)

El nemátodo parasitario *Ditylenchus dipsaci* principalmente se encuentra en los tallos y en los bulbos de la cebolla, es un endoparásito migratorio, en figura 6-2 se puede observar que tiene una forma alargada, en su etapa adulta llega a medir entre 1-1,5 mm de largo, su reproducción es anfimictica, se da cuando la población de machos es mayor que la de hembras, la que es capaz de poner entre 400 a 600 huevos, el ciclo biológico dura entre 21 a 28 días a 20°C, y en una temperatura de 15°C tarda entre 28-34 días. Presenta 4 etapas de desarrollo: empieza en huevecillos, en segundo lugar la etapa larvaria, luego la etapa de pre-adulto, y finalmente es adulto. El nemátodo se encuentra en el suelo a una profundidad de 3 a 10 cm, en todas sus etapas es capaz de infectar a la planta, excepto en la cuarta etapa porque puede desecarse y es incapaz de mantenerse en estado de anhidrobiosis. (Senasica, 2015)



**Figura 6-2:** Morfología de *Ditylenchus dipsaci*  
Fuente: (Esquivel, 2014)

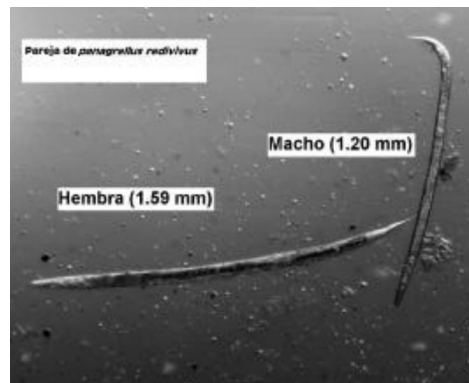
El nemátodo en condiciones ambientales favorables es capaz de infectar la semilla, cuando el cultivo es tierno puede entrar por cualquier parte de la planta, a medida que la planta madura los nemátodos entran por el bulbo, o por los estomas, se desarrolla mejor en suelos húmedos, las plantas afectadas son amarillentas, raquíticas y pequeñas en comparación al resto del cultivo. (Guiñez, 2015)

Cuando el nemátodo ataca a la semilla, la plántula crece deforme, clorótica y habitualmente muere, en los cultivos adultos se puede notar la infección porque las hojas son de forma irregular se decoloran y caen al suelo. Los bulbos de las cebollas se ponen fofos, deformes y con pocas raíces, una vez que la planta ha sido atacada por el *Ditylenchus dipsaci* queda susceptible a la agresión de otros patógenos que favorecen a la putrefacción del vegetal.

La manera adecuada de prevenir la infestación del suelo con nemátodos es la rotación de cultivos que no sean afectados por la raza de *Ditylenchus dipsaci*, como la zanahoria, papa, maíz, trigo entre otros.

### 2.2.8. Género *Panagrellus redivivus*

*Panagrellus redivivus* es un nemátodo de vida libre, su morfología se puede evidenciar en la figura 7-2, donde se destaca su color blanco transparente, su cuerpo es liso cilíndrico, miden entre 0,5 a 2 mm de longitud, habita en medio terrestre y acuático, se alimenta de bacterias, levaduras y hongos, sus movimientos son adelante hacia atrás gracias a sistema muscular longitudinal, su cuerpo se encuentra recubierto de una cutícula que le protege de la deshidratación y de condiciones ambientales adversas.



**Figura 7-2:** Pareja de *Panagrellus redivivus*  
**Fuente:** (Microgusano, 2014)

La reproducción de este nemátodo es sexual, los machos se caracterizan por ser más pequeños y menos numerosos que las hembras, su ciclo reproductivo depende mucho de mantener las condiciones de temperatura y humedad adecuadas, son ovovivíparos, liberan entre 10 y 40 crías diarias, durante aproximadamente 25 días. (Microgusano, 2014)

A este nemátodo se lo conoce como microgusano, se lo utiliza como alimento vivo para peces y crustáceos, es un recurso de gran valor nutricional, contiene aproximadamente 62% de proteína, 24% de lípidos, y 17% de carbohidratos, en los últimos años los nemátodos de vida libre han sido ampliamente usados para la investigación científica, por su facilidad de cultivo y por su tolerancia a variaciones ambientales. (Lara, 2013)

### 2.2.9. Control de nemátodos fitoparásitos

Los nemátodos constituyen un gran problema en la agricultura, las pérdidas económicas ocasionadas por estos microorganismos son exuberantes, las técnicas más utilizadas para combatirlos es mediante el empleo de potentes compuestos químicos, pero esto representa un alto

riesgo de contaminación ambiental, por esta razón actualmente se desarrolla otras formas para controlar la cantidad de nemátodos en suelos cultivables, entre las que se puede mencionar el control biológico, la solarización, y la utilización de nematicidas específicos. (Andres, 2002)

La aplicación de la técnica más adecuada para combatir a estos plaguicidas, es necesario tomar en cuenta cuál es la especie que está invadiendo el cultivo, determinar su densidad poblacional, establecer los factores bióticos y abióticos relacionados con el patógeno, además también se debe conocer las relaciones antagónicas en las que intervienen estos microorganismos.

Los nematicidas químicos utilizados para el control de los nemátodos, tienen la característica de ser volátiles como por ejemplo el dicloropropano – dicloropropeno (D-D) y los plaguicidas de uso general como el bromuro de metilo, cloropicrina y metil-isocianato, que no solo matan nemátodos, sino también hongos y malas hierbas, sino también actúan sobre los hongos y malas hierbas, así como los compuestos organofosforados como los etoprofos, fenamifos y los carbamatos como el aldicarb, carbofuran, benfuracarb y oxamilo, causan daños ambientales, molestias en la salud de productores y consumidores, por esta situación su aplicación en muchos lugares del planeta está restringido (FAO, 2016)

La solarización es un método físico utilizado para el control de nemátodos y consiste en elevar la temperatura del suelo empleando un plástico de color negro, con lo cual se alcanzan temperaturas entre 50 y 55°C a una profundidad de 5cm. y de 40 a 42°C a profundidades de 20 y 25 cm, de esta manera se logra desinfectarlo, este proceso controla gran cantidad de patógenos en el suelo como malezas, insectos y nemátodos. Otro método físico utilizado para el control de fitoparásitos es la inundación, que consiste llenar de agua determinadas extensiones de terreno, durante varios días. (FAO, 2017)

#### ***2.2.10. Obtención de extractos vegetales***

Para obtener los extractos, la muestra debe ser recolectada y tratada según las necesidades de la investigación y de la aplicación a realizarse, se utilizan solventes orgánicos, los cuales extraen sustancias en base a su constitución química, luego se someten a un proceso de evaporación y concentración en condiciones de bajas temperaturas con la finalidad de conservar su estructura original y por consiguiente mantener su actividad.

El tipo de extracción puede ser:

- Sólido – líquido
- Líquido – líquido

El método más utilizado de extracción es el soxhlet. (Wichtl, 2004)

#### 2.2.10.1. Método soxhlet.

La extracción soxhlet, constituye el método estándar más utilizado para la extracción de muestras sólidas, consiste en colocar la muestra triturada en un cartucho de material poroso, se calienta el disolvente contenido en el matraz por un periodo de tiempo determinado, los vapores condensados del solvente se ponen en contacto con el cartucho que contiene la muestra. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra, y luego se evapora y concentran los metabolitos extraídos por el disolvente.

Este tipo de extracción presenta varias ventajas como: el contacto repetitivo entre la muestra y el disolvente fresco, favorece la solubilidad de los analitos, no es necesario filtrar la extracción.

El proceso se aplica para distintos tipos de material sólido, es esencial que la muestra este seca, para evitar que existan errores al mezclarse el solvente con el agua de la muestra.

El rendimiento del proceso se calcula con la siguiente expresión:

$$(\%) = \frac{m_2 - m_1}{M} \cdot 100$$

En donde:

$m_1$ : masa en g del matraz de fondo redondo vacío (con trozo de porcelana y soporte).

$m_2$ : masa en g del matraz de fondo redondo con grasa (con trozo de porcelana y soporte) tras el secado.

M: peso de la muestra en g. (R. Cela, 2012)



## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Hipótesis

##### 3.1.1. *Hipótesis General*

Los extractos acetónicos y metanólicos obtenidos del *Pleurotus ostreatus*, presenta actividad nematocida.

##### 3.1.2. *Hipótesis Específicas*

H<sub>0</sub>: No actúa ningún extracto con efecto nematocida

H<sub>1</sub>: Al menos un extracto presenta actividad nematocida

#### 3.2. Variables

##### 3.2.1. *Variable Dependiente.*

Eficacia de los extractos obtenidos del *Pleurotus ostreatus*

##### 3.3.2. *Variables Independientes.*

- Solvente utilizado
- Concentración de los extractos
- Especie de nemátodo

#### 3.3. Tipo de investigación

La investigación es de tipo descriptiva y experimental, pues está soportada en base a la revisión bibliográfica, observación de ensayos e interpretación de los mismos.

### 3.4. Diseño de la investigación

En el presente trabajo de investigación usará un análisis DMS (diferencia mínima significativa) tradicional con 3 repeticiones. Con las variables, extractos (E), concentraciones (C), nemátodos (N). Se aplicará la prueba de tuckey para comparar las medias de cada una de las variaciones que se hacen en los ensayos

El diseño aplicado en los ensayos será, diseño trifactorial, E x C x N, 2x3x3.

**Tabla 1-3:** Diseño trifactorial

| Extracto | % Concentración | Tipo de Nemátodo | Repetición |
|----------|-----------------|------------------|------------|
| E1       | C1              | N1               | R1         |
|          |                 |                  | R2         |
|          |                 |                  | R3         |
|          |                 | N2               | R1         |
|          |                 |                  | R2         |
|          |                 |                  | R3         |
|          | C2              | N1               | R1         |
|          |                 |                  | R2         |
|          |                 |                  | R3         |
|          |                 | N2               | R1         |
|          |                 |                  | R2         |
|          |                 |                  | R3         |
| C3       | N1              | R1               |            |
|          |                 | R2               |            |
|          |                 | R3               |            |
|          | N2              | R1               |            |
|          |                 | R2               |            |
|          |                 | R3               |            |

Elaborado por: Estefania Aldaz 2018

Donde:

E1= Extracto Acetónico

C1= Concentración del extracto (1=75%; 2=50%; 3=25%)

N1= Nemátodo *Panagrellus redivivus*

N2= Nemátodo *Ditylenchus dipsaci*

R1= Numero de repeticiones (Todos los ensayos triplicados)

Se aplica el mismo modelo para

E2= Extracto metanólico

### **3.5. Unidad de análisis**

La unidad de análisis en esta investigación está representada por extracto acetónico y metanólico obtenido del *Pleurotus ostreatus*

### **3.6. Etapas de la investigación**

#### **3.6.1. Materiales equipos y reactivos**

##### **Materiales**

- Papel Aluminio
- Papel filtro
- Cuchillo
- Tijeras
- Reverbero
- Dos mangueras
- Soporte universal
- Pinzas
- Soxhlet
- Frascos oscuros
- Pala
- Fundas ziploc
- Guantes
- Marcador permanente
- Embudo de cristal
- Soporte metálico
- Servilletas gruesas
- Criba de 25 $\mu$ m
- Cronometro
- Pipetas Pasteur
- Cajas Petri descartables

- Cajas tripetri descartables
- Pizeta
- Puntas para pipeta descartables
- Matraz Erlenmeyer 100 ml

### **Equipos**

- Microscopio
- Estereoscopio
- Balanza analítica

### **Reactivos**

- Acetona
- Metanol

### **3.6.2. Obtención de la biomasa de *Pleurotus ostreatus***

#### **3.6.2.1. Producción de semilla**

Se prepara el medio de cultivo agar sabouraud, siguiendo las indicaciones del recipiente del producto, en condiciones totalmente asépticas. En la cámara de flujo, se vierte aproximadamente 20 mL de medio de cultivo en cada caja Petri. Una vez solidificado el agar, con ayuda de una aza esterilizada, se toma la cantidad adecuada de la cepa de *P. ostreatus* y se coloca en forma de cruz en la caja Petri, se sellan las cajas y se las ubica en una incubadora a la temperatura de 25°C por 4 días. (Figura 1-3).



**Figura 1-3:** Inóculo de *Pleurotus ostreatus*  
**Fuente:** Estefania Aldaz 2017

### 3.6.2.2. *Obtención de la semilla o inóculo.*

Para la masificación del *P. ostreatus* se utiliza como sustrato semilla de trigo, la cual se remoja durante 24 h, luego de este periodo retirada el exceso de agua, se coloca el trigo en una solución de Benomyl al 0.02%, se deja que actúe durante 30 o 40 min. Después de este tiempo se enjuaga el trigo, y se deja secar hasta que alcance un 50% de humedad. Se llena hasta las tres cuartas partes de los recipientes con semilla de trigo y se esteriliza en el autoclave, posteriormente se procede a la siembra del *P. ostreatus*, colocando en forma invertida trozos de agar con micelio.

Los frascos sellados y etiquetados se incuban a 25°C durante 10-15 días, hasta que el trigo este totalmente invadido del micelio. Cuando ya todo el frasco está invadido de una estructura blanca y algodonosa está listo para sembrar en el sustrato. (Figura 2-3).



**Figura 2-3:** Frascos invadidos con *P. ostreatus*  
Fuente: Estefania Aldaz 2017

### 3.6.2.3. *Incubación*

Para el crecimiento de los hongos se usan residuos preferentemente con alto contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina. Se lava el sustrato y se lo deja remojar en agua fría durante 12 horas para que alcance una humedad del 70-80%. Posteriormente se escurre y se pasteuriza el sustrato a 90° por un periodo de una hora, se escurre y se coloca en una solución de benomyl al 0.02% durante 30 minutos, finalmente se secar al ambiente hasta que tenga un 50% de humedad.

Se mezcla el inóculo del hongo con el sustrato en una relación 1:10 (inóculo-sustrato), y se colocan en fundas transparentes, se las identifica adecuadamente y se las cierra.

Se colocan las fundas a 28°C en el lugar de colonización en un ambiente de obscuridad. Es necesario al cabo de 48 horas realizar pequeños orificios en las fundas, con la finalidad de tener una aireación para favorecer el desarrollo micelial del hongo en el sustrato. (Figura 3-3)



**Figura 3-3:** Incubación hongo *P. ostreatus*  
**Fuente:** Estefania Aldaz 2017

#### *3.6.2.4. Fructificación*

Esta fase empieza cuando el sustrato ha sido colonizado totalmente por el micelio y al exponer las fundas a la luz se forman los primordios, los cuales seguirán creciendo para formar el cuerpo fructífero del hongo. Esta fase se caracteriza por cambiar las condiciones del cultivo, aumentando la luminosidad, humedad relativa y temperatura, consiguiendo así un mejor desarrollo de los hongos. Los primordios formados al cabo de 8 días se transforman en los cuerpos fructíferos.

#### *3.6.2.5. Cosecha*

Esta fase consiste en la recolección de los cuerpos fructíferos, que se lo realiza mediante un simple movimiento de torsión en la base del estipe. Dependiendo de las condiciones y fundamentalmente del sustrato utilizado se pueden realizar hasta cuatro cosechas.

#### *3.6.3. Preparación de la muestra*

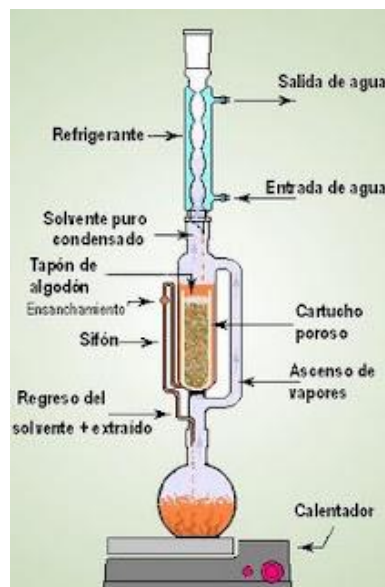
Según la bibliografía consultada este proceso se inicia con el troceado del cuerpo fructífero, al cual se le somete a un proceso de deshidratación durante 24 horas a 60°C. El proceso se lo realiza de una manera cacerá, ya que el ensayo no tiene como fin el consumo humano, es decir no se controla de manera estricta las condiciones sépticas. (Figura 4-3).



**Figura 4-3:** Deshidratación casera de hongo *P. ostreatus*  
**Fuente:** Estefania Aldaz 2017

#### 3.6.4. *Obtención de los extractos*

La obtención de los extractos acetonico y metanolico del *P. ostreatus*, constituye un proceso de extracción sólido-líquido, que consiste en separar los principios activos del hongo mediante el uso de solventes como la acetona y metanol sometidos a un sistema de reflujo en el equipo soxhlet. (Figura 5-3)



**Figura 5-3:** Equipo soxhlet  
**Fuente:** (FAO, 2017)

En una relación 1:2 (sólido-líquido), se coloca 25g del hongo deshidratado en el dedal y 50 ml de solvente en el balón, se mantiene la temperatura de ebullición del solvente, en el caso de la acetona

a 56°C y del metanol a 65°C, por un tiempo de aproximadamente seis horas. Posteriormente se concentra los extractos en el rotavapor. (Figura 6-3).



**Figura 6-3:** Equipo soxhlet utilizado  
Fuente: Estefania Aldaz 2017

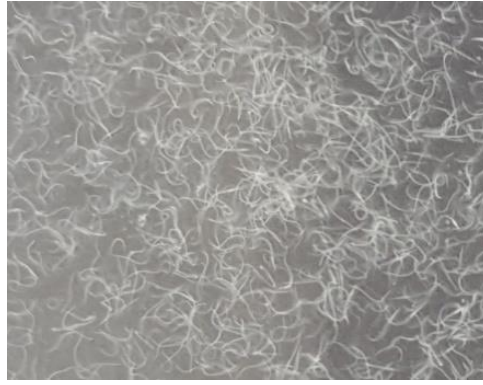
### 3.6.5. *Obtención de nemátodo Panagrellus redivivus*

El nemátodo *P. redivivus*, fue facilitado por el laboratorio de Ciencias biológicas. Este es un microgusano de vida libre que crece en avena. Para poder realizar los ensayos se recoge de las paredes del recipiente al microgusano, utilizando un pincel y se los enjuaga, mediante un tamiz con luz de malla de 25 micras se separa los nemátodos y se recoge en una caja Petri, para observarlos en el estereoscopio. (Figuras 7-3 y 8-3).



**Figura 7-3:** Paredes de recipiente con *P. redivivus*  
Fuente: Estefania Aldaz 2017





**Figura 8-3:** Observación de *P. redivivus* en el estereoscopio  
**Fuente:** Estefania Aldaz 2017

### 3.6.6. *Obtención del nemátodo Ditylenchus dipsaci*

Este nemátodo está presente en las raíces de la cebolla, para capturarlos se busca a plantas enfermas. Se recoge la raíz completa de la planta, con una considerable cantidad de suelo, y se coloca en una bolsa ziploc con su respectiva etiqueta. Para extraer los nemátodos de la raíz de la planta se usa el método de Baermann, que consiste en la migración de las larvas hacia el fondo del sistema. (Guiñez, 2015)

Se inicia colocando en una servilleta gruesa un puñado de tierra incluyendo las raíces de la planta, evitando que se riegue, en un embudo de cristal se acopla un tubo de ensayo, y en la parte superior del embudo se coloca una malla, que sirve de soporte para la muestra de suelo. La muestra debe estar en contacto con el agua, se deja en contacto por 24 horas, luego se retira la muestra de suelo. El agua, se coloca en un tamiz con luz de malla de 25 micras, aquí quedan atrapados los nemátodos, los mismos son recogidos en una caja Petri. (FAO, 2016) (Figura 9-3)

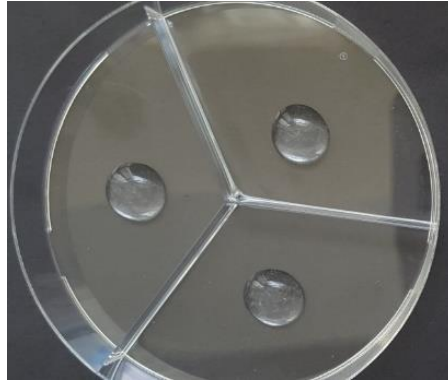


**Figura 9-3:** Embudo Baermann con muestras de suelo

**Fuente:** Estefania Aldaz 2017

### 3.6.7. *Determinación in vitro de la actividad nematocida*

Una vez obtenidos los extractos acetónicos y metanólicos del *P. ostreatus*, se procede a realizar los ensayos de la actividad nematocida, a las concentraciones de 75%, 50% y 25%. Para la realización de las pruebas se utiliza cajas Tri-petri y se pone el mismo número de nemátodos en los tres compartimentos de la caja Petri.(Figura 10-3)



**Figura 10-3:** Nemátodos en la caja petri

**Fuente:** Estefania Aldaz 2017

A los nemátodos *P. redivivus*, se los puede observar a simple vista, pero, para capturarlos se necesita de la ayuda del estereoscopio, éstos son difíciles de atrapar ya que su movimiento es muy rápido, su concentración aproximada se determina en una gota de agua, y después que están muertos contarlos con precisión y a su vez determinar el porcentaje de mortalidad.

Para los ensayos, es necesario capturarlos, con la ayuda del estereoscopio y una pipeta Pasteur, y coloca la misma cantidad de nemátodos en los tres compartimientos de la caja Petri, posteriormente añadir el extracto y determinara la acción nematocida del hongo que está determinado por el tiempo en el cual reaccionan los nemátodos, que según la revisión bibliográfica, es aproximadamente de una hora.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Análisis de la varianza

La cantidad del extracto acetónico obtenido fue de 7ml y del extracto metanólico fue de 9ml.

##### 4.1.1. Mortalidad de los nemátodos por la acción de los extractos metanólico y acetónico del *Pleurotus ostreatus* en las diferentes concentraciones.

Para el estudio in vitro, se realizó el análisis de varianza para los valores obtenidos de mortalidad de las dos especies de nemátodos *Ditylenchus dipsaci* y *Panagrellus redivivus* cuando son sometidos a la acción nematocida de los extractos acetónicos y metanólicos del *Pleurotus ostreatus* en las concentraciones de 25, 50 y 75 %, durante 1 hora. (Anexo A)

En la tabla 1-4 se expresan los valores obtenidos del análisis de varianza realizado para determinar las diferencias significativas entre tratamientos y la comparación de medias, mediante el uso del DMS y la prueba de Tukey al 5%.

**Tabla 1-4:** Cuadro de Análisis de la Varianza para porcentaje de mortalidad

| F.V.                                       | SC        | gl        | CM       | F      | p-valor |
|--|-----------|-----------|----------|--------|---------|
| <b>Extractos</b>                           | 2142,15   | <b>1</b>  | 2142,15  | 75,54  | <0,0001 |
| <b>Concentraciones</b>                     | 25093,95  | <b>2</b>  | 12546,98 | 442,43 | <0,0001 |
| <b>Nemátodos</b>                           | 1375,17   | <b>1</b>  | 1375,17  | 48,49  | <0,0001 |
| <b>Extractos*concentraciones</b>           | 50,84     | <b>2</b>  | 25,42    | 0,90   | 0,4213  |
| <b>Extractos*nemátodos</b>                 | 220,52    | <b>1</b>  | 220,52   | 7,78   | 0,0102  |
| <b>Concentraciones*nemátodos</b>           | 1469,08   | <b>2</b>  | 734,54   | 25,90  | <0,0001 |
| <b>Extractos*concentraciones*nemátodos</b> | 632,02    | <b>2</b>  | 316,01   | 11,14  | 0,0004  |
| <b>Error</b>                               | 680,63 24 | <b>24</b> | 28,36    |        |         |
| <b>Total</b>                               | 31664,36  | 35        |          |        |         |

Elaborado por: Estefania Aldaz 2018

C.V. = 7,62

P-valor > 0.05 y > 0.01 no significativo  
< 0.05 y > 0.01 significativo  
< 0.05 y < 0.01 altamente significativo

Según el análisis de varianza de la tabla 1-4, se observa que existe diferencias altamente significativas, entre extractos, concentraciones, nemátodos, así como con las interacciones concentraciones-nemátodos y extractos-concentraciones-nemátodos. Mientras que para la interacción extractos-nemátodos existe diferencias significativas, y en la interacción extractos-nemátodos no presenta diferencia significativa.

La significancia entre los tratamientos nos permite aceptar la hipótesis alterna y las pruebas de separación de medias permiten conocer que tratamiento es el mejor.

Los extractos obtenidos fueron preparados a partir del cuerpo fructífero del hongo. El porcentaje de mortalidad de los extractos acetónicos y metanólicos fue del 70 y 95% respectivamente, estos valores concuerdan con los reportados por Lilia Sánchez (2016), que en su investigación titulada “Evaluación de la actividad nematicida de extractos del hongo *Pleurotus ostreatus*” reportan una mortalidad de nemátodos del 90%.

#### 4.1.2. *Mortalidad de las dos especies de nemátodos por la acción del extracto metanólico y acetónico*

En la tabla 2-4, se observan los valores medio de mortalidad de los nemátodos obtenida cuando son expuestos a los extractos *del Pleurotus ostreatus*.

**Tabla 2-4:** Prueba de DMS al 5% para porcentaje de mortalidad en extracto

| Extracto | Medias | Rango |
|----------|--------|-------|
| E1       | 77,63  | A     |
| E2       | 62,21  | B     |

Elaborado por: Estefania Aldaz 2018

De la tabla 2-4, se establece que el extracto con mayor índice de mortalidad es el acetónico, con una media de 77,63% y que está en el rango A, mientras que el extracto metanólico presenta un menor grado de mortalidad, con una media de 62,21% y se ubica en el rango B.

Estos resultados se comparan con la investigación de Alvear L., en donde la mortalidad del nemátodo *Meloidogyne sp.*, en el extracto metanólico alcanza el 99,10%, mientras que extracto acuoso apenas alcanza 1,4%. Estas diferencias de mortalidad puede deberse al tipo de solvente utilizado para extraer la toxina. (Lizeth, 2017)

Los resultados obtenidos en la presente investigación tienen relación con los reportados por Heydari R, y Pourjam L en 2006, quienes en su investigación demostraron que el porcentaje de mortalidad, varía de acuerdo a la especie del nemátodos.

**Tabla 3-4:** Prueba de DMS al 5% para porcentaje de mortalidad en nemátodos

| Nemátodo | Medias | Rango |
|----------|--------|-------|
| N2       | 76,10  | A     |
| N1       | 63,74  | B     |

**Elaborado por:** Estefanía Aldaz 2018

Los datos obtenidos en la tabla 3-4, permiten establecer que el nemátodo *Ditylenchus dipsaci*, presenta mayor índice de mortalidad, cuando es tratado con los extractos del *P. ostreatus*, alcanzando una media de 76,10% y el rango A. Mientras que el nemátodo *Panagrellus redivivus*, al ser considerado nemátodo modelo, presenta mayor resistencia al efecto nematicida de los extractos acetónico y metanólico del *Pleurotus ostreatus* con una media de 63,74% y ocupando el rango B, aspecto que puede ser por las mejores características morfológicas, y de adaptabilidad que presenta este nemátodo, comportamientos que están relacionados con otras investigaciones como, las de Sierra quien utilizó dos especies del hongo *Pleurotus spp.*, sobre los nemátodos *Meloidogyne spp.* y *Radpholus spp.* asociados a los cultivos de tomate y plátano. Los datos obtenidos en esta investigación son superiores a los reportados por Heydari (2006), quién obtuvo un 10.6 % de mortalidad del nemátodo *Meloidogyne spp.* utilizando un extracto acuoso.

#### **4.1.3. Porcentaje de mortalidad de las dos especies de nemátodos por las diferentes concentraciones de los extractos del *Pleurotus ostreatus***

La tabla 4-4 expresa los datos obtenidos de la acción nematicida en función de las diferentes concentraciones utilizadas de los extractos del hongo, considerando la prueba de tukey al 5% de confiabilidad.

**Tabla 4-4:** Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de mortalidad en concentración.

| Concentración | Medias | Rango |
|---------------|--------|-------|
| 75%           | 93,78  | A     |
| 50%           | 82,87  | B     |
| 25%           | 33,12  | C     |

Elaborado por: Estefania Aldaz 2018

Según la tabla 4-4, se puede evidenciar que la mayor tasa de mortalidad se obtiene a la concentración de los extractos del 75%, con una media del 93,78% alcanzando el rango A, mientras que la concentración del 25% presenta un menor índice de mortalidad, siendo la media 33.12% ocupando el rango C, valores que son superiores a los reportados por Senasica (2015) quien realizó la investigación titulada Nemátodo del tallo y de los bulbos en donde reportó una mortalidad del 45%.

#### 4.1.4. Porcentaje de mortalidad de los nemátodos en la interacción extractos – concentración

En la tabla 5-4, se detallan los datos obtenidos de los comportamientos de la acción nematicida del *Pleurotus ostreatus* en función de la concentración de solvente utilizado para la obtención de los extractos, mediante la prueba de tukey.

**Tabla 5-4:** Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de mortalidad en la interacción extracto concentración.

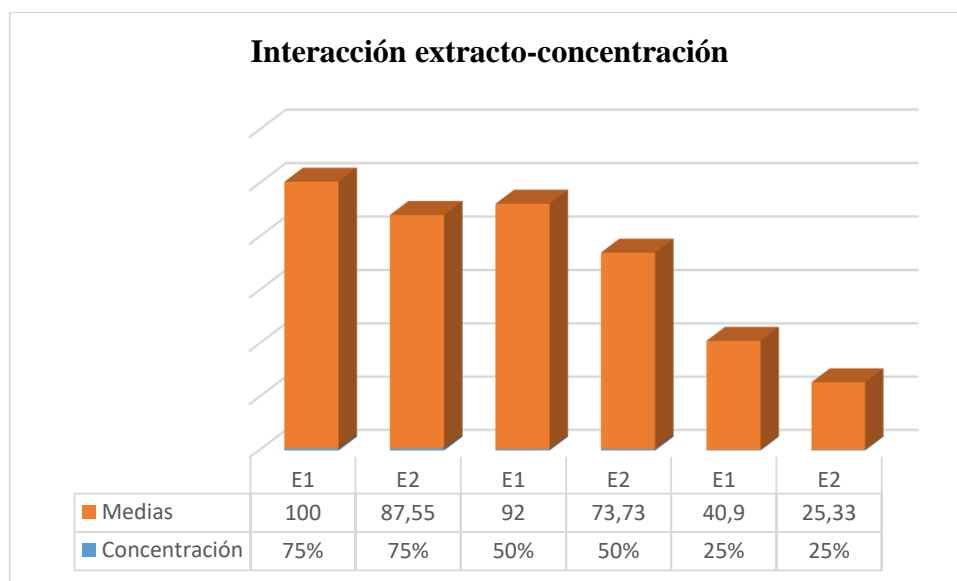
| Extracto | Concentración | Medias | Rango |
|----------|---------------|--------|-------|
| E1       | 75%           | 100,00 | A     |
| E1       | 50%           | 92,00  | A B   |
| E2       | 75%           | 87,55  | B     |
| E2       | 50%           | 73,73  | C     |
| E1       | 25%           | 40,90  | D     |
| E2       | 25%           | 25,33  | E     |

Elaborado por: Estefania Aldaz 2018

Los valores de la tabla 5-4, permiten establecer que el extracto acetónico al 75%, presenta la mayor mortalidad con una media del 100% y el rango A, de la misma manera se establece que en el otro extremo se encuentra el extracto metanólico que a una concentración del 25%, tiene una media de mortalidad del 25,33% y se ubica en el rango E, los resultados obtenidos sin embargo están acordes a los reportados por Zhang (2014) en la investigación titulada Nematode Tropping Fungi.

Según los estudios realizados por Ana López en la investigación titulada “Evaluación de extractos de cuatro especies de plantas y sus compuestos orgánicos sobre la mortalidad de *radopholus similis* en condiciones in vitro”, indican que el extracto acetónico presenta mejores resultados para matar *R. similis*, mientras que el extracto metanólico presente menor índice de mortalidad.

Mientras la concentración de un producto sea mayor, sus resultados serán mejores, por la presencia y metabolitos dispersos en la solución. La relación entre extracto y concentración es positiva, ya que aumentan de manera proporcional.



**Gráfico 1-4:** Interacción extracto concentración.

**Elaborado por:** Estefania Aldaz 2018

En el gráfico 1-4 se observa el porcentaje de mortalidad que presenta cada uno de los extractos, de acuerdo con la concentración utilizada. Se identifica que el extracto con mayor eficiencia es el tratamiento E.

#### 4.1.5. Porcentaje de mortalidad de los nemátodos en la interacción extracto – nemátodo

La tabla 6-4, contiene los datos obtenidos de la prueba de tukey al 5% de confiabilidad de la interacción entre los extractos acetónico y metanólico del *Pleurotus ostreatus* y el tipo de nemátodo utilizado.

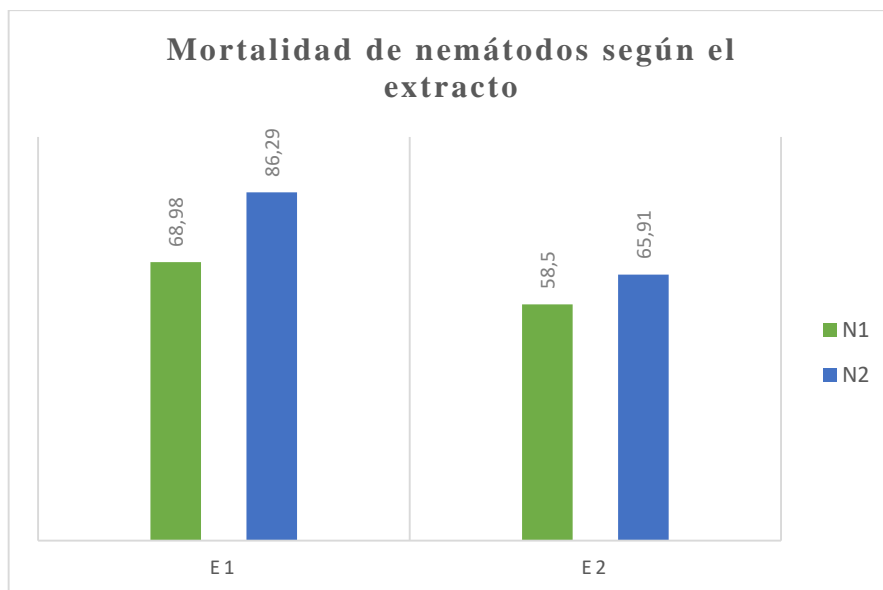
**Tabla 6-4:** Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de mortalidad en la interacción extracto nemátodo

| Extracto | Nemátodo | Medias | Rango |
|----------|----------|--------|-------|
| E1       | N2       | 86,29  | A     |
| E1       | N1       | 68,98  | B     |
| E2       | N2       | 65,91  | B     |
| E2       | N1       | 58,50  | C     |

Elaborado por: Estefania Aldaz 2018

De los datos se establece que, el mejor índice de mortalidad presenta el extracto acetónico para actuar sobre el nemátodo *Ditylenchus dipsaci* representado como N<sub>2</sub>, con una media de 86,29% y se ubica en el rango A, esto puede deberse que el nemátodo es muy sensible a la acción de los compuestos que se presentan en el extracto acetónico. (Sierra 2014). Mientras que el nemátodo *Panagrellus redivivus*, al ser tratado con el extracto metanólico, presenta una baja mortalidad, reflejado en la media de 58.50% y rango C. estos valores sin embargo están dentro de los rangos reportados por Barron (2011), que en su trabajo Destruction of nematodes by species of *Pleurotus* obtuvo medias del 75% de mortalidad con un extracto etil cetónico.





**Gráfico 2-4:** Mortalidad de nemátodos según el extracto.

Elaborado por: Estefania Aldaz 2018

En la gráfica 2-4 de mortalidad de nemátodos, se observa que los N<sub>2</sub> (*Ditylenchus dipsaci*) mueren en mayor porcentaje, mientras que *P. redivivus* es un nemátodo que presenta menor índice de mortalidad.

#### 4.1.6. Porcentaje de mortalidad de los nemátodos en la interacción concentración de nemátodo

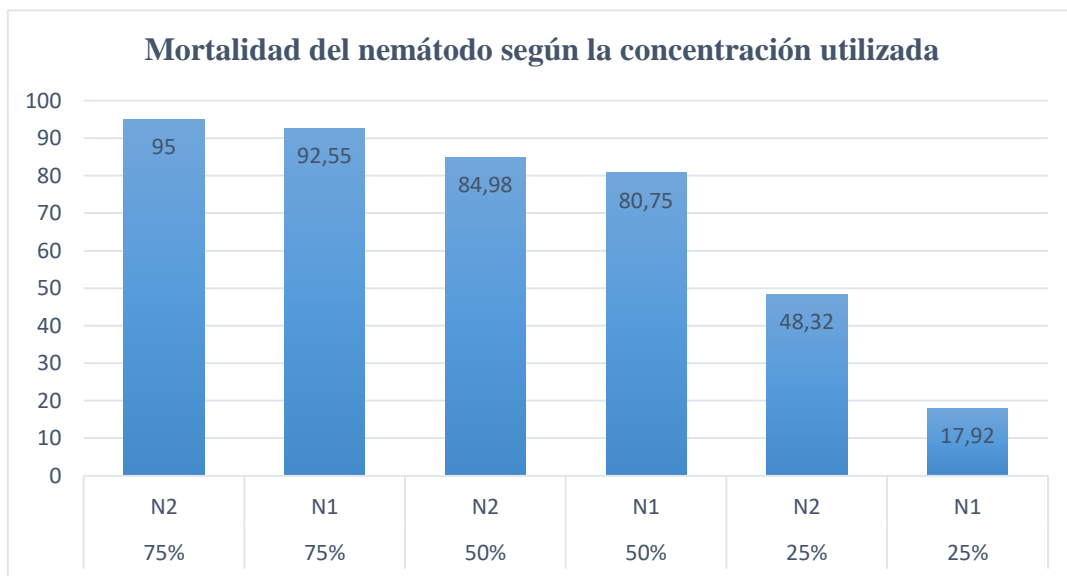
Los datos de la tabla 7-4, permiten determinar que la mayor tasa de mortalidad presenta el nemátodo N<sub>2</sub> (*Ditylenchus dipsaci*) con el extracto acetónico a una concentración del 75% alcanzando una media del 95% por consiguiente de acuerdo a la prueba de tukey se ubica en el rango A. Mientras que el menor índice de mortalidad presenta el nemátodo N<sub>1</sub> (*Panagrellus redivivus*) con el extracto metanólico al 25% de concentración, y media de 17,92% por consiguiente se ubica en el rango E. Estos resultados están en concordancia con los valores obtenidos en las interacciones anteriores así como con los resultados reportados por Barron (2011).

**Tabla 7-4:** Prueba de Tukey al 5% para para porcentaje de mortalidad en la interacción concentración nemátodo.

| Concentración | Nemátodo | Medias | Rango |
|---------------|----------|--------|-------|
| 75%           | N2       | 95,00  | A     |
| 75%           | N1       | 92,55  | A B   |
| 50%           | N2       | 84,98  | B C   |
| 50%           | N1       | 80,75  | C     |
| 25%           | N2       | 48,32  | D     |
| 25%           | N1       | 17,92  | E     |

Elaborado por: Estefania Aldaz 2018

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*



**Gráfico 3-4:** Mortalidad del nemátodo según la concentración utilizada

Elaborado por: Estefania Aldaz 2018

En función de los datos obtenidos, Tabla 7-4 se tienen los valores del porcentaje de la mortalidad de los nemátodos según la concentración del extracto utilizada, en el gráfico 3-4 se observa que las concentraciones que mejor efecto presentan son a 75 y 50%.

**4.1.7. Porcentaje de mortalidad de los nemátodos en la interacción extracto - concentración de nemátodo**

En la tabla 8-4, se encuentran los datos obtenidos a través de las interacciones entre los extractos y la concentración del nemátodo luego de realizar la prueba de tukey al 5% de confiabilidad.

**Tabla 8-4:** Prueba de Tukey al 5% para para porcentaje de mortalidad en la interacción extracto concentración nemátodo

| Extracto | Concentración | Nemátodo | Medias | Rango |
|----------|---------------|----------|--------|-------|
| E1       | 75%           | N2       | 100,00 | A     |
| E1       | 75%           | N1       | 100,00 | A     |
| E1       | 50%           | N2       | 94,43  | A     |
| E2       | 75%           | N2       | 90,00  | A B   |
| E1       | 50%           | N1       | 89,57  | A B   |
| E2       | 75%           | N1       | 85,10  | A B C |
| E2       | 50%           | N2       | 75,53  | B C D |
| E2       | 50%           | N1       | 71,93  | C D   |
| E1       | 25%           | N2       | 64,43  | D     |
| E2       | 25%           | N2       | 32,20  | E     |
| E2       | 25%           | N1       | 18,47  | E     |
| E1       | 25%           | N1       | 17,37  | E     |

Elaborado por: Estefania Aldaz 2018

Del análisis comparativo de los datos de la tabla 8-4 de la diferentes interacciones entre extractos, concentraciones, y nemátodos, se puede establecer que en el rango o nivel A se encuentran las interacciones entre, extracto acetónico (E<sub>1</sub>) al 75% de concentración matando al nemátodo *Ditylenchus dipsaci* (N<sub>2</sub>), que representa la mejor interacción ya que el valor de la media alcanzó

el 100%. La segunda mejor interacción tiene una media de 100%, cuando sobre el nemátodo *Panagrellus redivivus* (N<sub>2</sub>), el extracto acetónico (E<sub>1</sub>) al 75% de concentración y con una media de 94,43%, en cambio la interacción entre el extracto acetónico al 50% y el nemátodo *Ditylenchus dipsaci*, representa la tercera interacción exitosa.

En el rango E se encuentran las interacciones entre, extracto metanólico (E<sub>2</sub>) al 25% de concentración y el nemátodo *Ditylenchus dipsaci* (N<sub>2</sub>) con una media de 32,20%, extracto metanólico (E<sub>2</sub>) al 25% de concentración y el nemátodo *Panagrellus redivivus* (N<sub>1</sub>) con una media de 18,47%, y el extracto acetónico (E<sub>1</sub>) al 25% de concentración y el nemátodo *Panagrellus redivivus* (N<sub>1</sub>) con una media de 17,37%, son las interacciones con peores resultados, esto se debe a que la concentración del extracto es muy baja, como se puede evidenciar del valor de las medias que la aplicación de los extractos al 25% de concentración no tiene un efecto nematocida considerable. Los datos de esta investigación sin embargo están cercanos e incluso iguales a los reportados por Sierra obtuvo mortalidades del 89 y 95 % en su trabajo “Evaluación de la acción nematocida in vitro e in vivo de especies de *Pleurotus ostreatus*”.

## CONCLUSIONES

- El extracto acetónico y metanólico del *Pleurotus ostreatus* si presenta actividad nematocida.
- El extracto acetónico al 75%, presenta mayor índice de mortalidad con los nemátodos *Panagrellus redivivus*, y *Ditylenchus dipsaci*.
- El extracto metanólico del *Pleurotus ostreatus*, si presenta actividad nematocida en todas sus concentraciones.
- El extracto acetónico del *Pleurotus ostreatus*, si presenta el mayor índice de actividad nematocida en todas sus concentraciones.
- Mediante los análisis estadísticos realizados, se determina que el extracto que presenta mayor eficacia, es el acetónico.
- El nemátodo *Panagrellus redivivus* es resistente a la acción de nematocidas.
- El tiempo de contacto necesario para que mueran la mayor cantidad de nemátodos es de una hora.

## RECOMENDACIONES

- Investigar técnicas más rápidas y precisas para el conteo de nemátodos.
- Desarrollar equipos de extracción continua, para la toxina del hongo *Pleurotus ostreatus*.

## GLOSARIO

**Dimorfismo sexual:** Condición de algunas especies de animales o de plantas que exhiben dos aspectos anatómicos diferentes.

**Monoxenico:** Parásito que cumple su ciclo evolutivo en un solo hospedador, este tipo de organismo solo requiere de una especie para cumplir todo su ciclo biológico.

**Heteroxenico:** Ciclo de vida de un parásito que necesita de más de un hospedador para completar su ciclo biológico.

**Anhidrobiosis:** Estado de detención estacional de las actividades vitales, para que sobreviva un organismo.

**Cloróticas:** Enfermedad de los vegetales, debida a la falta de sales, que origina la pérdida del color verde.

**Fofos:** Organismos que tiene aspecto esponjoso, flácido y de poca consistencia,

**Bromuro de metilo:** O bromometano es un compuesto orgánico halogenado, es un gas incoloro, de olor fuerte parecido al cloroformo, ininflamable.

**Metil-isocianato:** Producto químico utilizado en la elaboración de espuma de poliuretano, pesticidas y plásticos. Generalmente se manipula y transporta como líquido, combustible y explosivo.

**Etoprofos:** Organofosforado no sistémico con actividad insecticida y nematicida por contacto; posee buena capacidad de penetración. Interfiere la transmisión de impulsos nerviosos por inhibición de la acetilcolinesterasa.

**Fenaminfos:** Organofosforado sistémico con actividad nematicida e insecticida por contacto e ingestión, de amplio espectro; se distingue por su elevada actividad sobre nemátodos ectoparásitos y endoparásitos de las raíces y de la parte aérea. Puede ser absorbido por vía foliar y radical, si bien únicamente se aplica al suelo.

**Carbamatos:** Son pesticidas artificiales usados para controlar las poblaciones de insectos plaga. Son sustancias orgánicas conformadas por un átomo de nitrógeno unido a un grupo lábil, el ácido carbámico. Es un compuesto de alta toxicidad, baja estabilidad química y nula acumulación en los tejidos.

**Carbofuran:** Es el pesticida más tóxico de los carbamatos. Es utilizado para el control de insectos. Es un insecticida sistémico, significa que la planta lo absorbe por las raíces, y lo distribuye al resto de sus órganos como tallos, hojas, excepto frutos.

**Esporóforos:** Es una estructura que contiene esporas. Conocido como esporocarpio.

**Ácido linoleico:** Es un ácido graso perteneciente al grupo de las grasas omega 6, es un ácido graso polinsaturado.



## BIBLIOGRAFÍA

1. **AGUILAR, Maria Fe.** Ciencia y medio ambiente. España : CCMA, 2002.
2. **BARRON, G. y THORN, R.** *Destruction of nematodes by species of Pleurotus*. 2011, Canadian Journal of Botany.
3. **CASTRO, Hugo.** Manual para la capacitacion de trabajadores. [En línea]. [Citado el: 26 de 10 de 2017.] Disponible en <http://www.fao.org/docrep/005/Y1806S/y1806s08.htm>.
4. **CELA R., LORENZO A.,** *Técnicas de Sepacion de Química Analítica*. Madrid : Síntensis, 2012. ISBN.
5. **CHEGWIN A., IVONNE J., NIETO R.** *Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible Pleurotus ostreatus cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono*. 5, Bogota : Scielo, 2013, Vol. 37. ISSN.
6. **CURTIS, Helena.** *Curtis Biología*. Chile : Medica Panamericana, 2008.
7. **ESQUIVEL, Alejandro.** Curso optativo de nematología. [En línea] 2014. Disponible en: <http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/Courseinfo/Curso%20en%20Espanol/LAB%201%20%20Extracci%C3%B3n%202013.pdf>. [Citado el: 31 de 05 de 2017.]
8. **FAO.** Guia RVC/FAO para el diagnostico Parasitologico Veterinario. [En línea] FAO, 2016. [Citado el: 31 de 07 de 2017.] Disponible en [http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology\\_spanish/Baermann/Principle.htm](http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology_spanish/Baermann/Principle.htm).
9. **FAO.** Manual para la capacitacion de trabajadores. [En línea] 2017. [Citado el: 26 de 10 de 2017.] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/Y1806S/y1806s08.htm>.
10. **FIGUEROA TORRES, José.,** Morelos : HYPATIA, 17 de junio de 2014, Vol. I.
11. **GUIÑEZ, Abdon.** Nemátodos en Cebolla. [En línea] 10 de 03 de 2015. [Citado el: 23 de 06 de 2017.] Disponible en: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/seriesinia/NR15337.pdf>.
12. **GUNDE y CIMERMAN.,** *Medicinal value of the Genus Pleurotus*. Intenational Journal of medicinal mushrooms , págs. 69-80.

13. **GUZMAN, Miguel.** Actividad antioxidante y estudio químico del Hongo *Pleurotus Djamor* recolectado en Córoba. [En línea] Diciembre de 2009. Disponible en: <file:///F:/estudio%20quimico%20del%20hong.pdf>.
14. **HEYDARI R., POURJAM E., MAHAMADI E.** *Antagonistic Effect of some species of Pleurotus Ostreatus on the root-knot nematode, Meloidogyne in vitro*. Tehran : Asian Network for Scientific Information., 2006. Vol. 1812. ISSN.
15. **KEREM , Z, FRIESEM, D Y HADAR , Y.** Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. [En línea] Abril de 1992. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16348683>.
16. **KWOK, O.C.H., y otros.** National Center for Agricultural Utilization Research USDA. [En línea] 9 de Octubre de 1991. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00993748#page-1>.
17. **LARA, Ramon.** Importancia de los nemátodos de vida libre. [En línea] 23 de 03 de 2013. [Citado el: 30 de 11 de 2017.] Disponible en: <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n48ne/nematodo.pdf>.
18. **LOPEZ LLORCA, Luis V. y BÖRJE JANSSON, Hans.** Biodiversidad de suelo: Control Biológico de nemátodos Fitopatógenos por Hongos Nematofagos. [En línea] Febrero de 2001. Disponible en: <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/1152>.
19. **LOZANO, Victor, PEREZ, Manuel .** Control biológico de plagas y enfermedades vegetales. [En línea] 04 de 12 de 2015. [Citado el: 27 de 10 de 2017.] **Disponible en** <https://sgitt-otri.ua.es/es/empresa/documentos/ot-0811-control-biologico-de-plagas.pdf>.
20. **MEJIA, Luis.** Control biológico de Nemátodos Fitopatógenos. [En línea] Marzo de 2016. Disponible en: <http://agriculturers.com/control-biologico-de-nematodos-fitopatogenos/>.
21. **MENDEZ, Victor.** Control biológico de plagas y enfermedades vegetales. [En línea] 23 de 10 de 2014. [Citado el: 11 de 11 de 2017.] Disponible en: <https://sgitt-otri.ua.es/es/empresa/documentos/ot-0811-control-biologico-de-plagas.pdf>.
22. **MOHAMMAD , Reza Moosavi y Rasoul, Zare.** Fungi as biological control agents of plants-parasitic Nematodes. *Plant defence Biological Control*. s.l. : Springer, 2011, págs. 67-107.
23. **PEREZ, Victor Manuel.** Control biológico de plagas y enfermedades vegetales. [En línea] 23 de 10 de 2014. [Citado el: 11 de 11 de 2017.] Disponible en <https://sgitt-otri.ua.es/es/empresa/documentos/ot-0811-control-biologico-de-plagas.pdf>.

24. **PIEDRA, Ricardo** *Manejo Biológico de nemátodos fitoparásitos con hongos y bacterias*. 2008, Tecnología en Marcha, págs. 123-132.
25. **SANCHEZ, Lilia** *Evaluación de la actividad nematocida de extractos del hongo *Plerotus ostreatus**. 2016. 1, Tlaxcala : Universidad Politécnica de Tlaxcala, 2016, Vol. 1. ISBN.
26. **SAGÚÉS, María** *Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nemátodos*. 28, Buenos Aires : Elsevier Doyma, 2012, Vol. I.
27. **SENASICA**. Nematodo del tallo y de los bulbos. [En línea] 12 de 2015. [Citado el: 09 de 05 de 2017.] Disponible en: <http://www.cesaveson.com/files/docs/campanas/FTNo.18nematododeltalloydelosbulbos2.pdf>.
28. **SIERRA MONROY, Janeth**. Evaluacion de la acción nematocida in vitro e in vivo de especies de *Pleurotus* spp., sobre los nemátodos *Meloidoyne* spp. y *Radpholus* spp. asociados a los cultivos de tomate y plátano. [En línea] 2014. Disponible en: [http://www.bdigital.unal.edu.co/48613/1/Janeth\\_Alexandra\\_Sierra.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/48613/1/Janeth_Alexandra_Sierra.pdf).
29. **VARNERO, María T.** *Use of Lignocellulosic Forest Residues for Oyster*. Santiago de Chile : tecnol, 2010, Vol. II. 13-29.
30. **Wichtl, Max**. *Herbal drud and phytopharmaceuticals*. New York : medpharm, 2004. ISBN.
31. **ZHANG, KE- QIN**. *Nemotode-Trapping Fungi*. New York : Springer, 2014. ISBN/ISSN.

## ANEXOS

### Anexo A: Datos obtenidos de los ensayos con extracto acetónico

| Variaciones | %<br>Mortalidad | Concentración | Nemátodos<br>totales | Nemátodos<br>muertos | Tiempo |
|-------------|-----------------|---------------|----------------------|----------------------|--------|
| E1C1N1R1    | 100             | 75%           | 51                   | 51                   | 1h     |
| E1C1N1R2    | 100             | 75%           | 47                   | 47                   | 1h     |
| E1C1N1R3    | 100             | 75%           | 49                   | 49                   | 1h     |
| E1C1N2R1    | 100             | 75%           | 30                   | 30                   | 1h     |
| E1C1N2R2    | 100             | 75%           | 30                   | 30                   | 1h     |
| E1C1N2R3    | 100             | 75%           | 30                   | 30                   | 1h     |
| E1C2N1R1    | 93,33           | 50%           | 30                   | 28                   | 1h     |
| E1C2N1R2    | 87,50           | 50%           | 32                   | 28                   | 1h     |
| E1C2N1R3    | 87,88           | 50%           | 33                   | 29                   | 1h     |
| E1C2N2R1    | 96,67           | 50%           | 30                   | 29                   | 1h     |
| E1C2N2R2    | 93,33           | 50%           | 30                   | 28                   | 1h     |
| E1C2N2R3    | 93,33           | 50%           | 30                   | 28                   | 1h     |
| E1C3N1R1    | 17,65           | 25%           | 34                   | 6                    | 1h     |
| E1C3N1R2    | 23,08           | 25%           | 39                   | 9                    | 1h     |
| E1C3N1R3    | 11,36           | 25%           | 44                   | 5                    | 1h     |
| E1C3N2R1    | 60,00           | 25%           | 30                   | 18                   | 1h     |
| E1C3N2R2    | 63,33           | 25%           | 30                   | 19                   | 1h     |
| E1C3N2R3    | 70,00           | 25%           | 30                   | 21                   | 1h     |

**Anexo B:** Datos obtenidos de los ensayos con extracto metanólico

| Variaciones | %<br>Mortalidad | Concentración | Nemátodos<br>totales | Nemátodos<br>muertos | Tiempo |
|-------------|-----------------|---------------|----------------------|----------------------|--------|
| E2C1N1R1    | 84,62           | 75%           | 52                   | 44                   | 1h     |
| E2C1N1R2    | 86,96           | 75%           | 46                   | 40                   | 1h     |
| E2C1N1R3    | 83,67           | 75%           | 49                   | 41                   | 1h     |
| E2C1N2R1    | 86,67           | 75%           | 30                   | 26                   | 1h     |
| E2C1N2R2    | 93,33           | 75%           | 30                   | 28                   | 1h     |
| E2C1N2R3    | 90,00           | 75%           | 30                   | 27                   | 1h     |
| E2C2N1R1    | 82,98           | 50%           | 47                   | 39                   | 1h     |
| E2C2N1R2    | 68,18           | 50%           | 44                   | 30                   | 1h     |
| E2C2N1R3    | 64,58           | 50%           | 48                   | 31                   | 1h     |
| E2C2N2R1    | 70,00           | 50%           | 30                   | 21                   | 1h     |
| E2C2N2R2    | 73,33           | 50%           | 30                   | 22                   | 1h     |
| E2C2N2R3    | 83,33           | 50%           | 30                   | 25                   | 1h     |
| E2C3N1R1    | 15,15           | 25%           | 33                   | 5                    | 1h     |
| E2C3N1R2    | 14,63           | 25%           | 41                   | 6                    | 1h     |
| E2C3N1R3    | 25,58           | 25%           | 43                   | 11                   | 1h     |
| E2C3N2R1    | 40,00           | 25%           | 30                   | 12                   | 1h     |
| E2C3N2R2    | 33,33           | 25%           | 30                   | 10                   | 1h     |
| E2C3N2R3    | 23,33           | 25%           | 30                   | 7                    | 1h     |

**Anexo C:** Datos obtenidos de los ensayos con un nematicida químico.

| Variaciones | % Mortalidad | Concentración                     | Nemátodos totales | Nemátodos muertos | Tiempo |
|-------------|--------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|--------|
| CQN1R1      | 0,00         | según indicaciones del fabricante | 39                | 0                 | 1 h    |
| CQN1R2      | 0,00         |                                   | 41                | 0                 | 1 h    |
| CQN1R3      | 0,00         |                                   | 37                | 0                 | 1 h    |
| CQN2R1      | 13,33        |                                   | 30                | 4                 | 1 h    |
| CQN2R2      | 6,67         |                                   | 30                | 2                 | 1 h    |
| CQN2R3      | 10,00        |                                   | 30                | 3                 | 1 h    |

**Anexo D:** Selección y mortalidad de nemátodos (*Panagrellus redivivus*) en extracto acetónico



**Anexo D-1:** Nemátodos *Panagrellus redivivus* en extracto acetónico al 75%

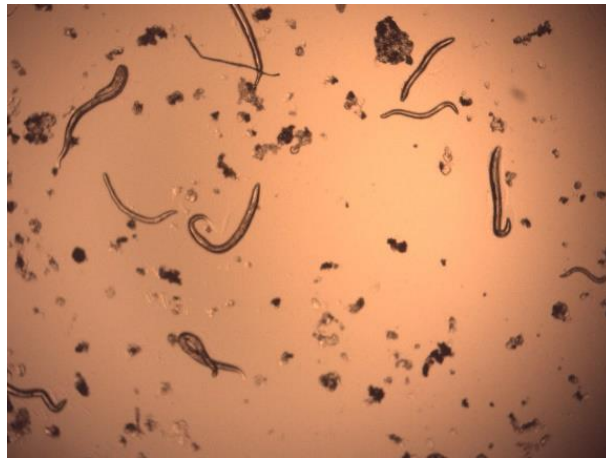


**Anexo D-2:** Nemátodos *Panagrellus redivivus* en extracto acetónico al 50%

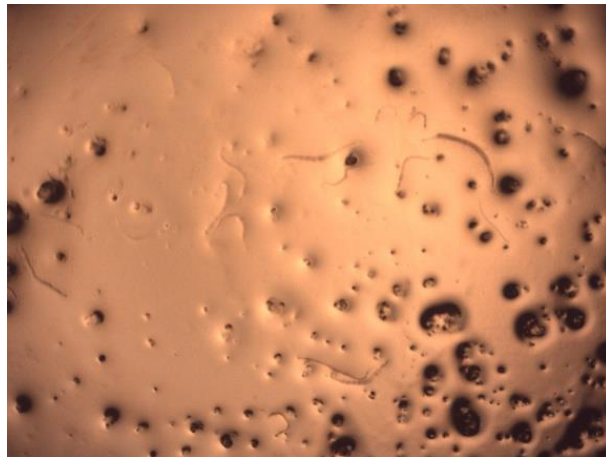


**Anexo D-3:** Nemátodos *Panagrellus redivivus* en extracto acetónico al 25%

**Anexo E:** Selección y mortalidad de nemátodos (*Panagrellus redivivus*) en extracto metanólico



**Anexo E-1:** Nemátodos *Panagrellus redivivus* en extracto metanólico al 75%



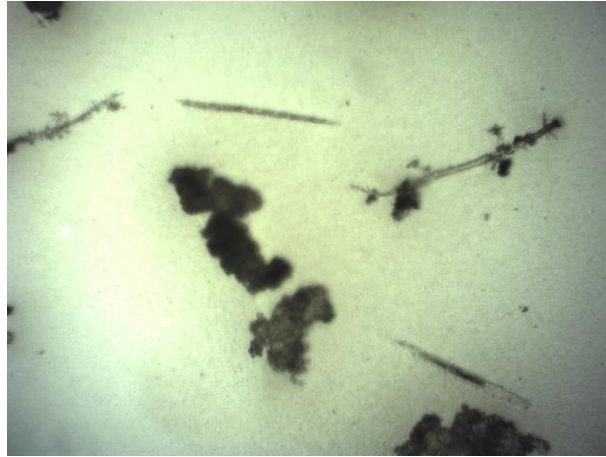
**Anexo E-2:** Nemátodos *Panagrellus redivivus* en extracto metanólico al 50%



**Anexo E-3:** Nemátodos *Panagrellus redivivus* en extracto metanólico al 25%



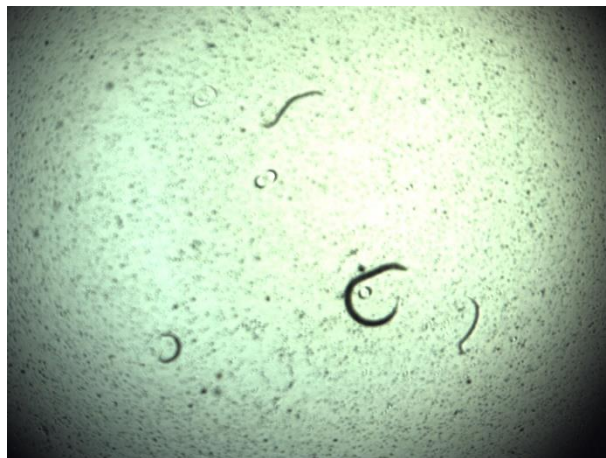
**Anexo F:** Selección y mortalidad de nemátodos (*Ditylenchus dipsaci*) en extracto acetónico



**Anexo F-1:** Nemátodos *Ditylenchus dipsaci* en extracto acetónico al 75%

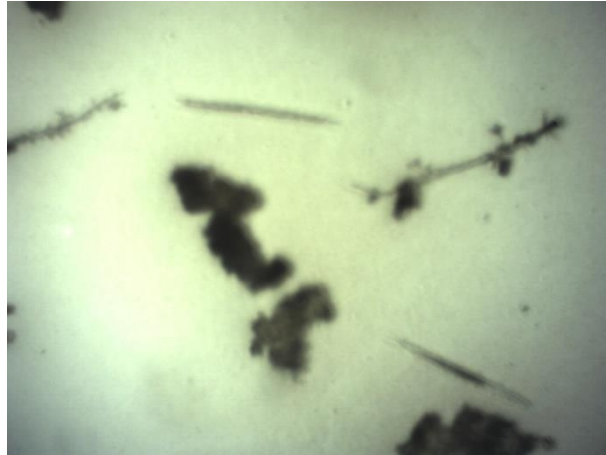


**Anexo F-2:** Nemátodos *Ditylenchus dipsaci* en extracto acetónico al 50%

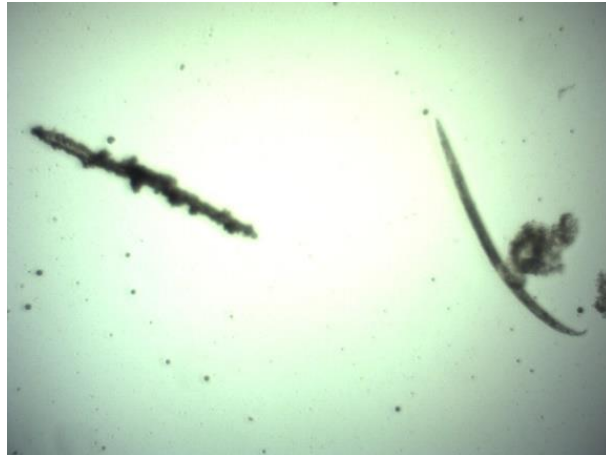


**Anexo F-3:** Nemátodos *Ditylenchus dipsaci* en extracto acetónico al 25%

**Anexo G:** Selección y mortalidad de nemátodos (*Ditylenchus dipsaci*) en extracto metanólico



**Anexo G-1:** Nemátodos *Ditylenchus dipsaci* en extracto metanólico al 75%



**Anexo G-2:** Nemátodos *Ditylenchus dipsaci* en extracto metanólico al 50%



**Anexo G-3:** Nemátodos *Ditylenchus dipsaci* en extracto metanólico al 25%