

# Aislamiento de hongos nativos para el manejo de nematodos fitoparásitos de la rizósfera del tomate (*Lycopersicon esculentum* L.)

Isolation of native fungi for handling of plant parasitic nematodes of tomato' rhizosphere

Norma Erazo<sup>1</sup>, Jhonny Guaminga<sup>2</sup>, Carlos Carpio<sup>3</sup>

Recibido: Agosto 2015 - Aprobado: Diciembre 2015

---

## RESUMEN

Se aislaron 41 hongos nativos a partir de cinco agro ecosistemas de las provincias de Chimborazo (4 muestras) y Tungurahua (1 muestra). Los principales géneros encontrados correspondieron a *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Paecilomyces* entre otros.

Mediante la técnica de nematodos cebo (Wyborn et al. 1969), las cepas aisladas se confrontaron con una suspensión de 90 nematodos, divididos en 3 grupos de 30 individuos. La especie de nematodo utilizada correspondió a *Passalorus*, presente en heces de conejo. Trascorridas 96 horas se registró los nematodos que presentaban estructuras parasíticas o sin actividad. Los datos obtenidos fueron analizados a través de pruebas no paramétricas (Prueba de kruskalwallis), arrojando diferencias altamente significativas (<0,0001), por lo que se realizó una comparación de medianas, de acuerdo al ranking. Los aislamientos nativos GUC, GUE, UTD, GUL, SLJ fueron los mejores estadísticamente, seguidos de las cepas PAD, SLB, SLE, SJA.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron aplicando diseño completo al azar (DCA) con tres repeticiones. Para el efecto, se utilizó nematodos fitoparásitos del género *Meloidogyne* aislados a partir de agallas de tomate, debidamente desinfectados y homogenizadas. Se colocaron concentraciones de 10<sup>8</sup> esporas de cada una de las cepas de hongos nativos y 40 nematodos por cada una de las tres repeticiones. Se registraron datos de inactividad de nematodos a las 24, 48, 72 y 96 horas; los datos obtenidos se sometieron a una transformación Bliss, usada para normalizar datos porcentuales. El análisis de varianza demuestran que hubo diferencias altamente significativas (<0,0001) para tratamientos, no para la interacción Tratamiento x Tiempo. La prueba de Tukey al 5% para el factor tratamiento, determinó que los aislamientos GUC (73.96%), SLB (70.21%) y SLE (66.67%) son los que presentan mayor porcentaje de inactividad de nematodos y pertenecieron a los géneros *Trichoderma*, *Paecilomyces* y *Acremonium* respectivamente.

**Palabras clave:** hongos nematofagos, nematicida, control biológico, nematodos cebo.

---

<sup>1</sup> Laboratorio de Ciencias Biológicas. Email: coprinus2@yahoo.com

<sup>2</sup> Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

<sup>3</sup> Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica Universidad Nacional Mayor San Marcos

**ABSTRACT**

41 native fungi were isolated from five agro ecosystems in the provinces of Chimborazo (4 samples) and Tungurahua (1 sample). The main genera found were for *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Paecilomyces* among others.

Using the technique of bait nematodes (Wyborn et al. 1969), isolates were compared with a suspension of 90 nematodes, divided into 3 groups of 30 individuals. The nematode species used corresponded to *Passalorus* present in feces rabbit. after 96 hours, the number of parasitized or inactive nematodes were counted. The data obtained were analyzed by nonparametric tests (test kruskalwallis) results showed highly significant (<0.0001), so a comparison of medians were performed, according to the ranking. The native isolates GUC, GUE, UTD, GUL, SLJ were the best statistically, followed by the PAD, SLB, SLE, SJA strains.

Pathogenicity tests were conducted using completely randomized design (CRD) with three replications. For this purpose, plant parasitic nematodes *Meloidogyne* galls isolated from tomato, properly sanitized and homogenized was used. Concentrations of  $10^8$  spores each of the strains native fungi and nematodes per 40 each placed three replications. Nematode data were recorded at 24, 48, 72 and 96 hours; data obtained underwent a transformation Bliss, used to normalize percentages. Analysis of variance showed that there were highly significant (<0.0001) for treatment, not for treatment for x Time interaction. Tukey test at 5% for the treatment factor, determined that the GUC (73.96%), SLB (70.21%) and SLE (66.67%) isolates are those with the highest percentage of inactivity nematodes and belonged to the genus *Trichoderma*, *Paecilomyces* and *Acremonium* respectively.

**Keywords:** Nematophagous fungi, nematicide, biological control, bait nematodes.

**I. INTRODUCCIÓN**

El suelo es uno de los ecosistemas más diversos y complejos en él se desarrollan interacciones de organismos que contribuyen a las diferentes cadenas alimenticias, lo que hace posible mantener un equilibrio biológico.

Entre los organismos habitantes de suelo se encuentran los nematodos, animales invertebrados constituidos por una amplia gama de especies. Se los ha ubicado dentro de cuatro grandes grupos tróficos. I) Micróvoros, que se alimentan de bacterias (bacterívoros) y hongos (fungívoros), II) Herbívoros, que se alimentan de las raíces de las plantas (aunque algunas especies parasitan tallos y hojas); III) Omnívoros y IV) predadores, que se alimentan de otros organismos edáficos (incluidos otros nematodos) y pueden ser importantes en la supresión de especies plaga o invasoras. (Campos-Herrera et al., 2008).

Dentro del campo agrícola, las especies fitoparásitos merecen especial atención, y aunque ellos corresponden a un grupo pequeño, alrededor del 4%, se estima que reducen la producción agrícola mundial entre un 12% y un 20%. (Talavera, 2003). *Meloidogyne* spp. es la especie más diseminada y abundante en el Ecuador, es considerada una especie

cosmopolita, establecida tanto en ambientes tropicales como templados. Según INIAP (2003) y Eguiguren y Défaz (1992), en Ecuador los nematodos causan pérdidas de 60 a 70% y de 68 a 75%, respectivamente, bajo condiciones de invernadero.

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

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

colección de aislamientos de hongos nativos procedentes de la rizosfera de cinco agro ecosistemas.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Muestreo de suelos

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

Se realizó un muestreo al azar siguiendo un patrón en zigzag. Con la ayuda de un barreno se tomó 5 sub muestras por cada suelo a una profundidad de 20 cm. (Valencia y Hernández 2002)

### 2.2 Determinación de pH, porcentaje de humedad y materia orgánica

Se mezcló 10 g de suelo con agua destilada en una proporción 1:2,5 la que se agitó por 10 minutos, luego de lo cual se registró las lecturas correspondientes de un Phmetro. (Willardet al., 1974; Bates, 1983)

La determinación del porcentaje de humedad, la misma que se realizó mediante diferencias de peso húmedo y seco, utilizando muestras de suelo colocadas en una estufa a 105 °C por 24 h, para ello se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{PH - PS}{PS} \times 100$$

PH = PESO HÚMEDO  
PS = PESO SECO

El porcentaje de materia orgánica se realizó mediante el método de ignición o calcinación, el mismo que consiste en someter la muestra a 450°C por 30 minutos, tomar el peso seco 2 y obtener las diferencias de pesos (Steubing, Godoy, & Alberdi, 2001).

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

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

### 2.3 Aislamiento de hongos de la rizósfera de tomate

Mediante el método de dilución seriada el cual consiste en pesar 20 g de suelo, colocarlo en 80 ml de agua destilada estéril, la muestra se mezcló con un agitador magnético por 15 minutos.

Posteriormente, se realizó diluciones sucesivas de  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . Con una micropipeta se tomó 100 µl de cada dilución y se vertió en cajas de Petri con medio de cultivo PDA + Cloranfenicol. Las muestras fueron dispersadas homogéneamente en toda la superficie de la placa mediante un rastrillo de vidrio estéril (Ramírez et al., 1992).

Las muestras se incubaron por un lapso de entre 3 días a 28°C, para los suelos de San Luis, Pallatanga, Estación experimental Querochaca y 5 días a temperatura ambiente (20-25°C) para los suelos de Guallanchi y San Juan. Después del período de incubación se contabilizó las colonias para determinar las UFC, luego de lo cual, se realizó el aislamiento y purificación de cada colonia.

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

### 2.4 Selección de aislamientos y prueba de antagonismo

Se tomaron discos de colonias de 1 cm de diámetro de cada uno de los aislamientos obtenidos y se colocaron en el centro de cajas de Petri con medio de cultivo Agar maíz 1/4, tres repeticiones por cada hongo. Se añadieron 90 nematodos cebo del género *Passalurus*, provenientes de heces de conejo, repartidos en 3 cajas de 30 cada uno. Las placas fueron evaluadas a los 4 días para contar en número de nematodos muertos o parasitados.

### 2.5 Extracción y desinfección nematodos

Los nematodos cebo fueron extraídos a partir de heces de conejo mediante embudos de Berman, 100 g de heces se colocaron en el embudo durante 24 h, los nematodos recolectados fueron centrifugados durante 1 minuto para lavarlos y eliminar el exceso de

agua, para lo cual se utilizó una solución al 2% de hipoclorito de sodio durante 1 minuto, posteriormente enjuagados con agua destilada estéril.

Los nematodos fitoparásitos se obtuvieron de agallas de raíces de tomate, las cuales se lavaron con abundante agua para eliminar el suelo, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 4% durante 5 minutos. Posteriormente, con la ayuda de un bisturí y la aguja de disección se separaron las agallas y se depositaron en placas Petri con agua destilada estéril más cloranfenicol (0,01 g/100 ml).

### 2.6 Pruebas de patogenicidad

Para evaluar el potencial antagonico, se efectuaron 3 repeticiones por cada hongo seleccionado, se utilizaron cajas tri-petri con medio de cultivo agar maíz ¼, en cada repetición se inoculó con 300 µl de una suspensión de esporas ( $10^8$ ), con el rastrillo se dispersó la muestra por toda la placa, se incubaron durante 3 días, para finalmente, colocar 0,5 ml de una suspensión de 40 nematodos fitoparásitos estandarizados mediante conteo de 5 alícuotas por repetición.

### 2.7 Evaluación

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

## 2.8 Análisis estadístico

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

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Caracterización de los agroecosistemas y sus suelos

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

La muestra de GU (Guallanchi) presenta el mayor contenido de humedad (49,5), el valor más bajo es de la muestra SJ (San Juan) (13,6). El contenido de materia orgánica de la muestra GU es la más alta (14,2). Tabla N° 1.

Tabla N° 1: Caracterización de las muestras de suelo

Código	Suelo	Textura	Uso	pH	H %	MO %
GU	GUALLANCHI	Arcilloso	Bosque	6,52	49,5	14,2
PA	PALLATNGA	franco areno arcilloso	Cultivo de tomate a campo abierto, manejo tradicional	6,58	18,6	4,1
SJ	SAN JUAN	franco arenosos	Cultivo de papa, manejo tradicional	7,49	13,9	2,9
SL	SAN LUIS	franca o franco- arenosa	Cultivo de tomate bajo invernadero, manejo tradicional	7,18	14,5	7,7
UT	UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO	franco arenoso	Cultivo de tomate, manejo orgánico	7,67	17,6	4,1

### 3.2 Hongos nativos relacionados a los agro ecosistemas del ensayo

De acuerdo a la Tabla N° 2 el mayor número de aislamientos fue mayor en el suelo procedente de Guallanchi (GU), este valor probablemente, se debe a que la muestra correspondió a una área de bosque andino nativo no intervenido con alto contenido de materia orgánica, donde se evidenció la existencia de una fuente y suministro de nutrimentos para los microorganismos del suelo, por lo que se deduce que habrá mayor número y diversidad de microorganismos (Arenas, 1993).

### 3.3 Selección de aislamientos

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

### 3.4 Pruebas de patogenicidad in vitro

El análisis de varianza mostro que existen diferencias altamente significativas ( $<0,0001$ ) entre los diferentes tratamientos (Tabla N° 5). Prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de nematodos inactivos.

Tabla N° 2: Aislamientos nativos

Suelo	Hongos	Géneros principales
GUALLAMCHI	10	<i>Alternaria, Trichoderma, Penicillium, Cladosporium, Cladophialophora</i>
PALLATANGA	7	<i>Aspergillus</i>
SAN JUAN	7	<i>Fusarium, Mucor, Penicillium, Aspergillus, Mucor, Paecilomyces, Epicoccum, Acremonium,</i>
SAN LUIS	10	<i>Alternaria, Trichoderma</i>
UTA	7	<i>Aspergillus, Fusarium, Botrytis</i>

Tabla N° 3: Cepas seleccionadas para pruebas in vitro

Procedencia	Código	Mediana	Ranking
Guallanchi	GUC	128,83	A
Guallanchi	GUE	124,33	A
Guallanchi	GUL	123,83	A
Universidad Técnica de Ambato	UTD	123,83	A
San Luis	SIJ	122,50	A
San Juan	SJA	114,50	AB
San Luis	SLE	113,67	AB
San Luis	SLB	109,50	AB
Pallatanga	PAD	108,83	AB

En la Tabla N° 6 se presentaron 5 rangos, siendo los mejores tratamientos T1, T6, T7 correspondientes a cepas de *Trichoderma*, *Paecilomyces* y *Acremonium* respectivamente.

Tabla N° 4: Análisis de varianza

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

Tabla N° 5: Prueba de Tukey al 5% para el factor tratamiento

Tratamiento	Medias	Rango
T1	73,96	A
T6	70,21	A
T7	66,67	A
T2	56,67	B
T8	56,46	B
T4	48,75	BC
T9	46,04	C
T5	40,21	CD
T3	35,00	D
T0	13,33	E

T0= Testigo, T1=*Trichoderma* 1, T2=Sin identificar, T3=*Cladophialophora*, T4=*Aspergillum*, T5=*Fusarium* 1; T6=*Paecilomyces*; T7=*Acremonium*, T8= *Trichoderma* 2, T9=*Fusarium* 2.

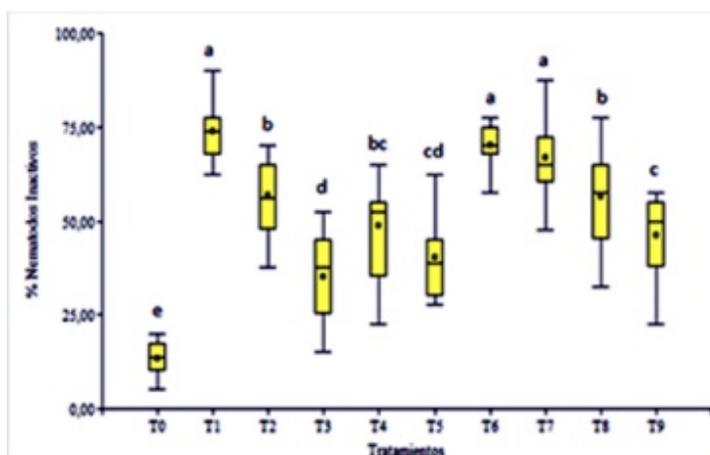


Figura N° 1: % Nematodos inactivos por tratamiento

#### IV. CONCLUSIONES

- 1 En condiciones in vitro los aislamientos *Trichoderma*, *Paecilomyces* y *Acremonium* a una concentración de  $10^8$  esporas/ml provocaron un porcentaje de inactividad de nematodos 73,96, 70,21 y 66,67 respectivamente, siendo considerados los aislamientos nativos con mejor potencial nematofago.
- 2 El mecanismo de acción de *Paecilomyces* y *Acremonium* fue de micoparasitismo, observando que las conidias se sitúan sobre el cuerpo de los nematodos fitoparásitos y por acción de enzimas destruyen su cutícula y proliferaban en el interior del nematodo.
- 3 En el género *Trichoderma* no se observó estructuras en el cuerpo de los nematodos, pudiendo suponerse que la acción del control se debió a micotoxinas.

#### V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Arenas, R. (1993). *Micología Médica Ilustrada. Clínica, laboratorio y terapéutica*. Primera Edición. McGraw Hill. México D.F. 397 p.
- 2 Baños, Y. et. al. (2010). Efecto de enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. en el manejo de *Meloidogyne* spp. *Rev. Bras. de Agroecología*. ; 5(2): 224 –233.

- 3 Cochrane, V. (1963). *Physiology of Fungi*. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York. 524 p.
- 4 Eguiguren, R. & Defas M. (1992). *Principales Fitonemátodos en el Ecuador Descripción Biología y Combate*, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Quito, Ecuador, Boletín Técnico N°21: 1, 14, 15.
- 5 Hugot, J.P., Baujard, P. & Morand, S. (2001). Biodiversity on helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*. 3:199-208.
- 6 INEC (2013). Documento electrónico: Consultado el 13 de abril del 2015. Disponible en [http://www.inec.gob.ec/espac\\_publicaciones/espac-2011/espac.swf](http://www.inec.gob.ec/espac_publicaciones/espac-2011/espac.swf)
- 7 INIAP (2003). «Control biológico del nematodo agallador *Meloidogyne* spp. con la bacteria *Pasteuria penetrans* en campos de producción» Documento electrónico: Consultado el 20 de mayo del 2015. Disponible en [http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Control\\_biologico\\_nematodo\\_agallador\\_Meloidogyne\\_spp.pdf](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Control_biologico_nematodo_agallador_Meloidogyne_spp.pdf)
- 8 Jatala, P. (1985). Biological control of nematodes. pp. 303-308. In: Sasser, J. N. & C. C. Carter (eds.). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Volume 1. North Carolina State.

- 9 Kullnig, C., R. L. Mach, M. Lorito & C. P. Kubicek (2000). «Enzyme Diffusion from *Trichodermaatroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctoniasolanis* a Prerequisite for Triggering of *TrichodermaEch 42* Gene Expression BeforeMycoparasitic Contact», *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2232- 2234, EE.UU.
- 10 Mendoza, P. & Valero, R. (2009) «Uso de Hongos Nematófogos: una herramienta biotecnológica para el control de nemátodos parásitos del ganado». Consultado el 18 de mayo del 2015. Disponible en <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3142/FolletoTecnicoN7.pdf?sequence=1>
- 11 Pérez, J. et. al. (2006). *Trichoderma*: alternativa para el control biológico de nematodos en el marco de una agricultura sostenible. *Rev. Fitosanidad*, 10 (2): 165.
- 12 Roman, J. & Acosta, N. (1984). «Nematodos Diagnostic Agnostic y Combate». Consultado el 20 de mayo del 2015. Disponible en <http://academic.uprm.edu/ofarrill/HTMLobj234/NematodosDiagnosticoyCombate.pdf>
- 13 Talavera, M. (2003). «Manual de nematología agrícola». Documento electrónico: Consultado el 1 de junio del 2015; Disponible en [https://www.academia.edu/172270/Iniciacion\\_a\\_la\\_Nematologia](https://www.academia.edu/172270/Iniciacion_a_la_Nematologia)
- 14 Xiujuan, Y., Xiujuan, H. & Liang, Z. (2000). Chitinasas of *Paecilomyceslilacinus*and studies on the biocontrol of plant parasitic nematodes. *ActaAgriculaeUniversitatisJiangxiensis* 22 (1):86-89.
- 15 Goswami, J, Pandey, RK & Tewari, J. (2008). Management of root knot nematode on tomato through application of fungal antagonists, *Acremoniumstrictum* and *Trichodermaharzia-num*. *J Environ Sci Health*.43:237-240.
- 16 Goswami, B. & Singh, S. (2004). Fungal bioagents for management ofroot-knot nematode in tomato.*Pestic Res J.* 16:9-12.
- 17 Campos-Herrera, R., Gómez-Rosa, J.M., Escuer, M., Cuadra, L., Barrios, L. & Gutiérrez, C. (2008). Diversity, occurrence, and life characteristics of natural entomopathogenic nematode populations from La Rioja (Northern Spain) under different agricultural management and their relationships with soil factors. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1474-1484.
- 18 Agnenin, N.O. (2011). Biological control of plant parasitic nematodes: Prospects and Challenges for the Poor Africa Farmer. *Plant Protection Science* 47(2):62-67.
- 19 Khant, T., Shadab, S., Afroz, R., Abdul M., Aziza A.M. & Farooqui M. (2011). Study of Suppressive Effect of Biological agent Fungus, Natural Organic Compound and Carbofuran on Root-knot Nematode of Tomato (*lycopersiconesculentum*). *Journal of Microbiology and Biotechnology* 1 (1):7-11
- 20 Soto, N., De Oliveira, J., Vega, R., Montero D., Vergas B., Hernandez R. & Orozco C. (2011). In-vitropredatory activity of nematophagous fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes.*Revista de Biología Tropical* 59(1):37-52.
- 21 Barrón, G.L. (1977). The nematode destroying fungi. Lancaster, Pennsylvania, USA. Lancaster Press, Inc. 14 0 p.
- 22 Li, T.F., Zhang, K.Q. & Liu, X.Z. (2000).Taxonomy of nematophagous fungi. Chinese Science and Technical Publishing, Beijing. 18 p
- 23 Kerry, B.R. (2000)..Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 38:423-441
- 24 Valencia, I. E.& B. A. Hernández (2002). Muestreo de suelos, preparación de muestras y guía de campo. UNAM.131 pp.
- 25 Wyborn, C., Priest, D. & Duddington, C. (1969). Selective technique for the determination of nematophagous fungi in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1,101–102.
- 26 Steubing, L., Godoy, R. & Alberdi, M. (2001). Métodos de ecología vegetal (Primeraedición ed.). Santiago de Chile, Chile: Editorial Universitaria, S.A.
- 27 Bates, R.G. (1983). Determination of pH, Wiley, New York.
- 28 Willard, H.H., Merrit, L.L. & Dean, J.A. (1974). Instrumental methods of analysis.5<sup>th</sup> edition Van Nostrand.
- 29 Ramírez, G.R.M., Luna, M.B., Mejía, Ch.A., Velázquez, M.O., Tsuzuki, R.G., Vierna, G.L. & Müggenburg, I. (1992). En: Manual de prácticas de microbiología general. Laboratorio de microbiología experimental. Facultad de Química, UNAM.