



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú](#).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**Biocontrol del nemátodo del nudo (*Meloidogyne incognita*) por micoendofíticos
aislados de sachá inchi (*Plukenetia* spp.) en condiciones de laboratorio**

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero agrónomo

AUTOR:

Amner Padilla Domínguez

ASESOR:

Ing. Eybis José Flores García

Tarapoto – Perú

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



Biocontrol del nemátodo del nudo (*Meloidogyne incognita*) por micoendofíticos aislados de sachá inchi (*Plukenetia* spp.) en condiciones de laboratorio

AUTOR:

Amner Padilla Domínguez

Sustentada y aprobada el día 06 de enero del 2017, por los siguientes jurados:

.....
Ing. Dr. Agustín Cerna Mendoza

Presidente

.....
Ing. M. Sc. Mannel Santiago Doria Bolaños

Miembro

.....
Blga. Dra. Yoni Meni Rodríguez Espejo

Secretaria

.....
Ing. Eybis José Flores García

Asesor

Declaratoria de autenticidad

Amner Padilla Domínguez, con DNI N° 71061801, egresado de la Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Agronomía, autor de la tesis que lleva como título: **Biocontrol del nemátodo del nudo (*Meloidogyne incognita*) por micoendofíticos aislados de sachá inchi (*Plukenetia* spp.) en condiciones de laboratorio.**

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. La redacción fue realizada respetando las citas y referencias de las fuentes bibliográficas consultadas.
3. Toda la información que contiene la tesis no ha sido auto plagiada;
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido alterados ni copiados, por tanto, la información de esta investigación debe considerarse como aporte a la realidad investigada.

Por lo antes mencionado, asumo bajo responsabilidad las consecuencias que deriven de mi accionar, sometiéndome a las leyes de nuestro país y normas vigentes de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

Tarapoto, 06 de enero del 2017.



.....
Bach. Amner Padilla Domínguez
DNI N° 71061801

Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis.

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres:	Padilla Dominguez Amner	
Código de alumno :	091123	Teléfono: 938457235
Correo electrónico :	amnerpadilla701@gmail.com	DNI: 71061801

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

Facultad de:	Ciencias Agrarias
Escuela Profesional de:	Agronomía

3. Tipo de trabajo de investigación

Tesis	<input checked="" type="checkbox"/>	Trabajo de investigación	<input type="checkbox"/>
Trabajo de suficiencia profesional	<input type="checkbox"/>		

4. Datos del Trabajo de investigación

Título:	Biocontrol del nematodo del nudo (<i>Meloidogyne incognita</i>) por micoendofíticos aislados de sachá indio (<i>Plukenetia spp.</i>) en condiciones de laboratorio
Año de publicación:	2019

5. Tipo de Acceso al documento

Acceso público *	<input checked="" type="checkbox"/>	Embargo	<input type="checkbox"/>
Acceso restringido **	<input type="checkbox"/>		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

6. Originalidad del archivo digital.

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12º del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI **“Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA”**.


.....
Firma del Autor

8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM – T.

Fecha de recepción del documento:

11 / 11 / 2019



.....
Firma del Responsable de Repositorio
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso
Abierto de la UNSM – T.

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

** **Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

Dedicatoria

A mis padres: **Silvestre Padilla López, María Zulema Domínguez García**, por su incondicional apoyo y sacrificio que me dieron para culminar con mucho éxito este presente trabajo de tesis. A mis hermanos **Gaudy, Edgar y Álvaro**, quienes gracias a su apoyo y confianza depositada en mí pude lograr mi meta propuesta.

A mis amigos, compañeros y personal que labora en el laboratorio de bioprospección del IIAP – SM por la enseñanza que me brindaron durante el transcurso de desarrollo de este trabajo de tesis.

Autor: Bach. Amner Padilla Dominguez.

Agradecimiento

Primeramente, quisiera agradecer a Dios, por darme la fuerza e intelecto necesario para afrontar este gran reto. A mis padres y familiares por el apoyo económico y moral que me brindaron durante todo el transcurso de desarrollo de mi tesis.

A la Universidad Nacional de San Martín por permitirme estudiar en sus aulas y poder culminar mi carrera universitaria con éxito. A mi asesor el Ing. Eybis J. Flores García por la disposición de su tiempo para orientarme durante el desarrollo de la tesis.

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP – SM), bajo la gerencia del Ing. Luis Alberto Arévalo López, quien por medio del proyecto de investigación denominado “Generación de tecnologías para el control integrado del nemátodo del nudo (*Meloidogyne incognita*) de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la región San Martín” teniendo como coordinador general al Ing. M. Sc. Kadir J. Márquez Dávila, por brindarme las facilidades del laboratorio de bioprospección para poder desarrollar el presente trabajo de investigación. Al personal que labora en el laboratorio de Bioprospección del instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana; Ing. José J. Cayotopa Torres, Delmar A. Cayotopa Olivera.

Autor: Bach. Amner Padilla Dominguez.

Índice general

Dedicatoria	vi
Agradecimiento	vii
Índice general	viii
Índice de tabla	x
Índice de figuras	xi
Resumen	xiv
Abstract	xv
Introducción	1
CAPÍTULO I	2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
1.1. Generalidades del cultivo de sachá inchi	2
1.1.1. Origen y distribución del cultivo.	2
1.1.2. Importancia.	2
1.1.3. Clasificación taxonómica.	2
1.1.4. Principales plagas y enfermedades.	3
1.2. Nemátodos fitopatógenos	3
1.2.1. Historia.....	3
1.2.2. Morfología general.....	4
1.3. Nemátodo del nudo (<i>Meloidogyne incognita</i>)	5
1.3.1. Clasificación zoológica.	5
1.3.2. Distribución mundial de <i>Meloidogyne</i>	6
1.3.3. Morfología.	6
1.3.4. Sintomatología	8
1.3.5. Control de <i>Meloidogyne</i> sp.	8
1.4. Hongos endofíticos	8
1.4.1. Clasificación.	9
1.4.2. Relación hongo endofítico – planta hospedera.	10
1.4.3. Metabolitos secundarios derivados de hongos endofitos.	10
1.4.4. Parasitismo de hongos endofíticos.	11
1.4.5. Características de los hongos endofíticos.	11
CAPÍTULO II	17

MATERIAL Y MÉTODOS	17
2.1. Tipo de investigación.....	17
2.2. Nivel de investigación	17
2.3. Diseño de investigación.....	17
2.4. Población y Muestra	17
2.4.1. Población.....	17
2.4.2. Muestra.	17
2.5. Sistema de hipótesis.....	17
2.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	18
2.6.1. Técnicas.	18
2.6.2. Instrumentos.....	18
2.7. Técnicas de procesamiento y análisis de datos	18
2.8. Métodos	18
2.8.1. Ubicación del ensayo.	18
2.8.2. Aislamientos de micoendofíticos.	19
2.8.3. Descripción de tratamientos en estudio.	21
2.8.4. Prueba de determinación del efecto parasítico de hongos endofíticos de sachá inchi a huevos y estadios juveniles de <i>Meloidogyne incognita</i>	23
2.8.5. Prueba del efecto in vitro de extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi sobre la eclosión de huevos y estadios juveniles de <i>Meloidogyne incognita</i>	29
2.8.6. Variables evaluadas.....	33
CAPÍTULO III.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
3.1. Parasitismo de hongos endofíticos a huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> en suelo en condiciones de laboratorio.....	34
3.2. Capacidad de inhibición de extractos fúngicos hacia la eclosión de huevos y estadios juveniles de <i>Meloidogyne incognita</i>	37
3.2.1. Dosis baja, al 50% de concentración.	37
3.2.2. Dosis media, al 70% de concentración.	40
3.2.3. Dosis alta, al 90% de concentración	43
RECOMENDACIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS.....	54

Índice de tabla

Tabla 1: Origen y ubicación de siete especies de <i>Plukenetia</i> sp.....	19
Tabla 2: Procedencia y clasificación taxonómica de 20 cepas de hongos endofíticos de sachá inchi.....	20
Tabla 3: Diseño experimental para la prueba de parasitismo de micoendofíticos de sachá inchi al nemátodo del nudo <i>Meloidogyne incognita</i>	21
Tabla 4: Diseño experimental para determinar el efecto in vitro de extractos fúngicos en tres dosis, dosis baja (50%), media (70%) y alta (90%) sobre la eclosión de huevos y estadios juveniles de <i>Meloidogyne incognita</i> , cada dosis con tres repeticiones.....	22
Tabla 5: Concentraciones de solución (extracto fúngico) y solución (huevos y estadios juveniles de <i>Meloidogyne incognita</i>) en tres dosis.....	23
Tabla 6: MIN medio bajo en nutrientes para antibiosis basado sobre la solución de nutrientes de (Huttermann & Volger, 1973).....	30
Tabla 7: Análisis de varianza del promedio de porcentaje de parasitismo de cepas de micoendofíticos de sachá inchi a huevos y estadios juveniles de <i>Meloidogyne incognita</i> , durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.ex), datos transformados a “ASeno (x/100)”.....	34
Tabla 8: Análisis de Varianza del promedio de porcentaje de eclosión de huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> , sometidos a extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi, durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.in), datos transformados a grados.....	38
Tabla 9: Análisis de Varianza del promedio de porcentaje de eclosión de huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> , sometidos a extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi, durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.in), datos transformados a grados.....	41
Tabla 10: Análisis de Varianza del promedio de porcentaje de eclosión de huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> , sometidos a extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi, durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.in), datos transformados a grados.....	44

Índice de figuras

- Figura 1:** Desarrollo de los huevos de una especie de *Meloidogyne*. A-S: Estadios de desarrollo desde una célula al segundo estadio larval. T: Segundo estadio larval. U: Segundo estadio larval mostrando la muda de cutícula (Taylor & Sasser, 1983).....6
- Figura 2:** Ciclo patológico del nódulo de la raíz producida por los nemátodos del género *Meloidogyne* (Agrios, 2005).....7
- Figura 3:** Laboratorio de Bioprotección del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP – San Martín). Fotos: Padilla. A. 2015.....19
- Figura 4:** Proceso de reactivación de cepas. 1) preparación de medio de cultivo PSA. 2) esterilización de materiales. 3) plaqueo de medio PSA + O en placas de de Petri de 15 x 60 mm. 4) viales conservados conteniendo micelio de los aislamientos. 5) extracción de agar conteniendo micelio de los aislamientos. 6) siembra de micelio en placas conteniendo medio PSA + oxitetraciclina. Fotos: Padilla. A. 2015.23
- Figura 5:** Cepas desarrolladas de *Trichoderma* sp: 1) aislamiento 32; 2) aislamiento 45; 3) aislamiento 54; 4) aislamiento 62. Fotos: Padilla. A. 2015.....24
- Figura 6:** Cepas desarrolladas de *Clonostachys* sp: 1) aislamiento 80; 2) aislamiento 84; 3) aislamiento 88; 4) aislamiento 116. Fotos: Padilla. A. 2015.....24
- Figura 7:** Cepas desarrolladas de *Pestalotiopsis* sp: 1) aislamiento 06; 2) aislamiento 99; 3) aislamiento 102; 4) aislamiento 135. Fotos: Padilla. A. 2015.....24
- Figura 8:** Cepas desarrolladas: 1, 2 y 3 (aislamientos 08; 27 y 152 de *Xylaria* sp), 4 (aislamiento 51 de *Acremonium* sp). Fotos: Padilla. A. 2015.....24
- Figura 9:** Cepas desarrolladas: 1 y 2 (aislamientos 117 y 130 de *Penicillium* sp); 3 y 4 (aislamientos 17 y 26 de *Phyalophora* sp). Fotos: Padilla. A. 2015.25
- Figura 10:** Proceso de conservación de cepas: 1) preparación de glicerol al 20%. 2) esterilización de materiales. 3) aislamiento desarrollado para su conservación. 4) realización de cortes longitudinales al medio de cultivo conteniendo micelio del aislamiento. 5) extracción y puesta de pequeños

trozos de agar conteniendo micelio en viales, para su posterior conservación a -20°C en una refrigeradora. Fotos: Padilla. A. 2015.25

Figura 11: Esterilización de suelo. Foto: Padilla. A. 2015.....26

Figura 12: Proceso de obtención de fuente de inóculo de hongos endofíticos de sachá inchi: 1) aislamiento de hongo endófito de sachá inchi. 2) incorporación de agua destilada estéril (ADE) y agitación de la masa de conidias. 3) transferencia de contenido a un vaso de prueba estéril. 4) transferencia de 1ml de esta suspensión a tubos ependorf. 5) cuantificación de conidias. 6) conidias de *Clonostachys* sp, foto tomada en un microscopio invertido. Fotos: Padilla. A. 2015.26

Figura 13: Proceso de obtención de fuente de inóculo de *Meloidogyne incognita*: 1) **a.** plantas de tomate, como fuente de inóculo de *M. incognita*; **b.** raíces con presencia de nódulos. 2) **c.** corte de raíces en aproximadamente 2 cm de longitud; **d.** trituración de raíces; **e.** agitación de raíces; **f.** tamizado de raíces. 3) **g.** puesta de suspensión líquida de nemátodos en un vaso de prueba. 4) **h.** conteo de huevos y juveniles de *M. incognita*. 5) **i.** presencia de huevos; **j.** presencia de estadios juveniles. Fotos: Padilla. A. 2015.....27

Figura 14: Proceso de inoculación del suelo con hongos endofíticos de sachá inchi y huevos de *Meloidogyne incognita*: 1) pesado de suelo (50 g). 2 y 3) inoculación de suelo con hongos endofíticos. 4) embolsado de placas conteniendo suelo estéril + hongos endófitos. 5) inoculación de suelo con huevos de *Meloidogyne incognita*. Fotos: Padilla. A. 2015.28

Figura 15: Proceso de evaluación de parasitismo de hongos endofíticos sobre *M. incognita*: 1) tamiz de PVC. 2) extracción de nemátodos. 3) tamizado de muestras. 4) conteo de juveniles. Fotos: Padilla. A. 2015.29

Figura 16: Proceso de producción de extractos fúngicos de micoendofíticos de sachá inchi: 1) fuente de inóculo conteniendo suspensión líquida de conidias de micoendófitos. 2) cuantificación de conidias. 3) matraces en agitación, produciendo metabolitos secundarios. 4) filtración de extractos fúngicos en tubos falcón de 50 ml. 5) aislamiento presentando impurezas. 6) centrifugado a 5 000 rpm. Fotos: Padilla. A. 2015.31

- Figura 17:** Proceso del efecto in vitro de extractos fúngicos a *Meloidogyne incognita*:
 1) cuantificación de huevos y juveniles (J2). 2) extractos fúngicos en el baño maría a 90°C. 3) proceso de puesta de concentraciones de huevos de *Meloidogyne incognita* más extractos fúngicos en tres dosis (50%; 70% y 90%). 4) tubos de ensayo de 150 x 15 mm conteniendo concentraciones de huevos de *Meloidogyne incognita* más extractos fúngicos. Fotos: Padilla. A. 2015.32
- Figura 18:** Huevo de *Meloidogyne incognita* en inmersión con extractos fúngicos de *Trichoderma* sp; Foto: Padilla. A. 2015.....33
- Figura 19:** Prueba de Duncan ($p<0,01$) del promedio de porcentaje de parasitismo (%) de micoendofíticos de sachá inchi a huevos y estadios juveniles de *Meloidogyne incognita* en placas de Petri con suelo estéril. Durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.ex). Comparados con el control sin inocular con hongos endofíticos, y si con huevos de *M. incognita*.35
- Figura 20:** Prueba de Duncan ($p<0,01$) del promedio de porcentaje de eclosión (%) de huevos de *Meloidogyne incognita*, sometidos a extractos fúngicos de micoendofíticos de sachá inchi en tubos de ensayo, de la dosis baja, al 50% de concentración. Durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.in).39
- Figura 21: Prueba de Duncan ($p<0,01$) del promedio de porcentaje de eclosión (%) de huevos de *Meloidogyne incognita*, sometidos a extractos fúngicos de micoendofíticos de sachá inchi en tubos de ensayo, en la dosis media, al 70% de concentración. Durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.in).42
- Figura 22:** Prueba de Duncan ($p<0,01$) del promedio de porcentaje de eclosión (%) de huevos de *Meloidogyne incognita*, sometidos a extractos fúngicos de micoendofíticos de sachá inchi en tubos de ensayo, en la dosis alta, al 90% de concentración. Durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.in).45

Resumen

El presente trabajo de investigación, tiene como objetivo encontrar una alternativa de biocontrol contra el nemátodo del nudo (*Meloidogyne incognita*), mediante la utilización de 7 géneros de hongos endófitos asociados al cultivo de sachá inchi (*Plukenetia* spp); para lo cual se evaluó el porcentaje de parasitismo hacia huevos y estadios juveniles (J2) y el porcentaje de eclosión de huevos de *M. incognita* sometidos a extractos fúngicos de micoendofíticos de sachá inchi. Se trabajaron con 20 tratamientos (4 cepas de *Clonostachys* sp; 4 cepas de *Trichoderma* sp; 4 cepas de *Pestalotiopsis* sp; 3 cepas de *Xylaria* sp; 2 cepas de *Penicillium* sp; 2 cepas de *Phyalophora* sp y 1 cepa de *Acremonium* sp) y un control. De los cuales para la prueba de parasitismo se trabajó con 21 tratamientos y 3 repeticiones, inoculando 500 huevos de *M. incognita*/50 g de suelo estéril y conidias de hongos endófitos en 1×10^6 ufc.cc en placas de Petri de 90 x 15 mm, realizando 4 evaluaciones a los 4; 8; 12 y 16 d.d.ex (días después de la exposición), siendo los tratamientos T2 (T2: XYL-E-27); T4 (T4: CLO-E-84) y T16 (T16: PEN-E-117) quienes mostraron mejores resultados con un índice de 91,67%; 92% y 92,33% de parasitismo durante las 4 evaluaciones a comparación de los demás tratamientos. Para la prueba del efecto *in vitro* de extractos fúngicos sobre la eclosión de huevos de *M. incognita* se trabajó con 21 tratamientos y 3 repeticiones, formulando 3 concentraciones (50%; 70% y 90%) en tubos de ensayo de 150 x 15 mm, e inoculando con 600 huevos de *M. incognita*, realizando 4 evaluaciones a los 4; 8; 12 y 16 d.d.in (días después de la inmersión) siendo la mejor concentración al 90% y teniendo como mejor resultado al T15 (T15: PES-E-135) con un índice de 5,67% de eclosión de huevos de *M. incognita* durante las cuatro evaluaciones a comparación de los demás tratamientos.

Palabras clave: *M. incognita*, hongos endófitos, parasitismo, extracto fúngico.

Abstract

The following research work aims to find a biocontrol alternative against the nematode of the knot (*Meloidogyne incognita*), through the use of 7 genders of endophytic fungi associated with the cultivation of sacha inchi (*Plukenetia* spp); which the percentage of parasitism on eggs and juvenile stages (J2) and the percentage of hatching of *M. incognita* eggs submitted to fungal extracts of mycoendophytic sacha inchi. We used 20 treatments (4 strains of *Clonostachys* sp, 4 strains of *Trichoderma* sp, 4 strains of *Pestalotiopsis* sp, 3 strains of *Xylaria* sp, 2 strains of *Penicillium* sp, 2 strains of *Phyalophora* sp and 1 strain of *Acremonium* sp) and one control. For the parasitism test, 21 treatments and 3 replicates were used, inoculating 500 eggs of *M. incognita* / 50 g of sterile soil and conidia of endophytic fungi in 1×10^6 ufc.cc in 90 x 15 Petri dishes mm, performing 4 evaluations at 4; 8; 12 and 16 d.a.exp. (days after exposure), with T2 treatments (T2: XYL-E-27); T4 (T4: CLO-E-84) and T16 (T16: PEN-E-117) which showed better results with an index of 91.67%; 92% and 92.33% of parasitism during the 4 evaluations compared to the other treatments. To test the in vitro effect of fungal extracts on egg hatching of *M. incognita*, 21 treatments and 3 replicates were prepared, formulating 3 concentrations (50%, 70% and 90%) in 150 x 15 mm test tubes, and inoculating with 600 eggs of *M. incognita*, performing 4 evaluations at 4; 8; 12 and 16 d.a.imm (days after immersion) being the best concentration at 90% and having T15 (T15: PES-E-135) as the best result with a 5.67% M hatch rate of *M. Incognita* during the four evaluations compared to the other treatments.

Keywords: *M. incognita*, endophytic fungi, parasitism, fungal extract.



Introducción

Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) es una oleaginosa de la familia Euphorbiaceae, que viene siendo estudiado, debido a su alto contenido en ácidos grasos esenciales (principalmente omegas) y proteínas, sustancias que las semillas concentran cantidades elevadas, con respecto a semillas de otras oleaginosas, tomando importancia económica e industrial en el mercado local, nacional e internacional.

En el País se le encuentra en su mayoría en estado silvestre, presentándose poco como cultivo intensivo, en la Región San Martín se encuentra en la cuenca del río Huallaga, en la provincia de Lamas, valle del Sisa, cuencas alta y baja del río Mayo, en la sub cuenca del río Cumbaza y en el Pongo de Caynarachi (Alvarez & Rios, 2007).

Siendo el principal problema fitosanitario el ataque del nemátodo del nudo (*Meloidogyne incognita*) que causa agallamiento en las raíces, impidiendo el normal funcionamiento fisiológico, y teniendo como consecuencia que la productividad del cultivo sea baja y que las plantas sucumban en el segundo año después de la siembra (Márquez, Gonzales, Arévalo & Solis, 2013).

Actualmente, el control químico es una de las medidas que más se utiliza para minimizar los daños causados por *Meloidogyne* sp. Sin embargo, una de sus principales limitaciones de uso es que contaminan el manto freático lo cual puede afectar a la salud humana, y si no se aplican de manera adecuada pueden ocasionar fitotoxicidad en las plantas y seleccionar poblaciones de nemátodos resistentes (Mendoza, Wilson & Colina, 2013). Para ello la utilización de hongos endófitos se postula como alternativa de biocontrol, ya que entre los beneficios más estudiados se encuentra la capacidad que inducen en el hospedero, mediante la producción de metabolitos secundarios como los alcaloides, de mitigar el efecto de otros hongos causales de enfermedad (Abello & Kelemu, 2006).

Donde a partir de agentes biocontroladores como los hongos endófitos de los géneros: *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Pestalotiopsis*, *Xylaria*, *Penicillium*, *Phyalophora* y *Acremonium*, se propuso realizar el presente estudio a fin de encontrar una alternativa de biocontrol sobre el nemátodo del nudo *Meloidogyne incognita* ya que es una opción más compatible con el ambiente, contribuyendo de esta manera a dar una solución a esta plaga que viene aquejando en este cultivo, ocasionando grandes pérdidas económicas a los productores de Sacha Inchi en nuestra región.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Generalidades del cultivo de sachá inchi

1.1.1. Origen y distribución del cultivo.

El género *Plukenetia* pertenece a la familia Euphorbiaceae y está compuesto por 19 especies. En el Perú se le encuentra en diversos lugares como San Martín, Ucayali, Huánuco, Cuzco, Amazonas, Loreto y Madre de Dios. En San Martín se encuentra en toda la cuenca del Huallaga, en la provincia de Lamas, en el Valle de Sisa, en Alto Mayo y Bajo Mayo. Crece desde los 100 hasta los 2 000 m.s.n.m.m (Manco, 2006).

1.1.2. Importancia.

Dentro de sus componentes se encuentran principalmente: proteínas, aminoácidos, ácidos grasos esenciales (omegas 3; 6 y 9) y vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) en contenidos significativamente elevados, respecto de semillas de otras oleaginosas (maní, palma, soya, maíz, colza y girasol). Investigaciones recientes realizadas con aceites omegas y vitamina E indican la importancia nutricional y terapéutica de su consumo para el control de radicales libres y una serie de enfermedades que estos originan en el organismo humano (Manco, 2006).

1.1.3. Clasificación taxonómica.

Gillespie (2007), menciona lo siguiente:

Reino	: Plantae
División	: Spermatophyta
Clase	: Dicotyledonae
Orden	: Euphorbiales
Familia	: Euphorbiaceae
Género	: <i>Plukenetia</i>
Especie	: <i>volubilis</i>
Nombre científico	: <i>Plukenetia volubilis</i> L.
Nombre común	: “Sacha Inchi, Maní del Monte”

1.1.4. Principales plagas y enfermedades.

a. Plagas.

Debido a que el sachu inchi es un cultivo que está en proceso de expansión agrícola, son pocas las plagas que se han detectado causándole daño. Entre ellas se encuentran las larvas comedoras de hojas, insectos chupadores de fruto en su estado lechoso, hormigas y "grillo topo" (*Grillotalpa* sp), éste último ataca al cultivo en su etapa inicial de desarrollo vegetativo, cortando a la planta en el "cuello". Si el "grillo topo" ataca a plantas muy pequeñas éstas no se recuperan, pero si ataca a plantas que tienen el "cuello" de regular grosor, vuelven a brotar; de igual forma, las hormigas constituyen ligeros problemas, especialmente al inicio de la plantación. Por ello es importante realizar un buen control de plagas en esta etapa del cultivo, evitándose de esta manera la labor de recalce o resiembra (Arévalo, 2000).

b. Enfermedades.

Las enfermedades que atacan a éste cultivo son varias, siendo la de mayor importancia los ataques tempranos de *Meloidogyne* sp (Nemátodo del nudo) y *Aphelenchus* sp, en suelos ácidos, alcalinos, franco arenosos con más del 70% de arena, arcillosos con más del 50% de arcilla y contenido medio de materia orgánica. Las plantas atacadas por nemátodos se atrofian y presentan entrenudos cortos, hojas pequeñas, luego se vuelven cloróticas. Asimismo, estos parásitos ingresan a las raíces produciendo heridas por donde fácilmente penetran los hongos (*Fusarium* sp, *Macrophomina* sp), dañando los tejidos y causando la pudrición total de las raíces, finalmente causan la muerte de las plantas (Alvarez & Rios, 2007).

Igualmente, se han reportado daños considerables ocasionados por hongos de los géneros *Stagonospora*, *Leptosphaeria*, *Rhizoctonia*, *Cronartium* y la especie *Colletotrichum gloeosporoides*, los cuales atacan hojas y tallos, tanto en estado de plántula como en ejemplares adultos asociados a daños por especies de *Meloidogyne*. También se menciona el ataque de babosas en condiciones de suelos enfangados (Dostert, Roque, Brokamp, Cano, La Torre & Weigend, 2009).

1.2. Nemátodos fitopatógenos

1.2.1. Historia.

En agosto de 1877, en la provincia de Rio de Janeiro, Brasil, Jobert (1878) citado por (Taylor & Sasser, 1983) al observar arboles de café enfermos encontró raíces fibrosas

con numerosas agallas, algunas de ellas terminales, otras a lo largo de la raíz y, otras, en las raíces laterales, conteniendo huevos elípticos encerrados en membranas hialinas que contenían pequeños animales vermiformes. Notó que los gusanos emergían de los huevos, salían de las raíces y se encontraban en grandes cantidades en el suelo. Diez años después, Goldi (1887) citado por (Taylor & Sasser, 1983) investigó el mismo problema y publicó un documento de 105 páginas acerca de la enfermedad de los cafetales. El señaló al nemátodo del nódulo de la raíz *Meloidogyne exigua* como la causa de la enfermedad y como la especie característica de un nuevo género, siendo las primeras investigaciones sobre una especie de *Meloidogyne* como causante de una enfermedad importante en un cultivo económico, fue Chitwood (1949), citado por (Taylor & Sasser, 1983) quien describió o re-describió las cuatro especies más comunes y ampliamente distribuidas: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria* y *Meloidogyne hapla*.

1.2.2. Morfología general.

La palabra nemátodo, proviene de los vocablos griegos *nema* que significa “hilo” y *eidés* u *oidos*, que significan “con aspecto de” (Guzmán, Castaño, Villegas, 2012).

Son microscópicos de 300 a 1 000 μm , siendo algunos mayores a 4 μm de longitud por 15 a 35 μm , de ancho (Agris, 2005), suelen tener forma de hilo no segmentados, recubiertos de una cutícula protectora y lo más llamativo de su organografía es el tubo digestivo, compuesto esquemáticamente por un estilete, esófago, intestino y ano. Los adultos son fácilmente identificables por la presencia de un sistema reproductor. Las hembras presentan uno o dos ovarios, útero, vagina, vulva y una o dos espermatecas donde se almacena el esperma. Los machos se distinguen fácilmente por la presencia de un aparato copulador en la cola, compuesto por las espículas, el gubernáculo y las alas caudales, constituyen el grupo más abundante de animales multicelulares en la tierra, ocupando la mayoría de hábitats (Talavera, 2003).

Los nemátodos fitoparásitos, según el género, tienen en la región anterior (cabeza) un estilete hueco (estomatoestilete u odontoestilete) también llamado “lanza”, pero hay algunos con estilete sólido modificado (onquioestilete). El estilete es usado para perforar o penetrar las células de las plantas y a través de él extraer los nutrientes, causando enfermedades en diferentes cultivos (Guzmán *et al.*, 2012), hay dos grandes grupos: los ectoparásitos, de éstos hay unos que se alimentan sobre los pelos radiculares y en las

células epidérmicas de la raíz, con un estilete muy débil (*Tylenchus*), y otros que se alimentan de las células profundas de los tejidos, como los transmisores de virus, que poseen un estilete muy largo (*Longidorus* y *Xiphinema*); otros son endoparásitos, dentro de estos unos son sedentarios, principalmente los de forma esférica (*Heterodera* y *Meloidogyne*), y otros son móviles (*Pratylenchus*) (Díez, López, Urbano & Bello, 2010).

1.3. Nemátodo del nudo (*Meloidogyne incognita*)

El primer informe de *Meloidogyne* se hizo en 1855, como un nemátodo que causaba nudos en las raíces de pepino, en invernaderos de Inglaterra (Cepeda, 1996). Los nemátodos formadores de nódulos de la raíz se encuentran en todo el mundo, pero con mayor frecuencia y abundancia en regiones con clima cálido y tórrido e inviernos cortos y moderados, estando presente con el mayor número de poblaciones donde el promedio anual de temperatura se encuentra dentro del rango de 18 a 30°C. A temperaturas inferiores a 15,4°C o superiores a 33,5°C las hembras no llegan a alcanzar su madurez (López, 2012). Es considerado el nemátodo de mayor importancia en el mundo debido a las grandes pérdidas que puede ocasionar al afectar las raíces de numerosos hospedantes con que cuenta (Hortalizas, Frutales, Leguminosas; etc.) (Torres, 2003).

1.3.1. Clasificación zoológica.

Según (Agrios, 2005), menciona la siguiente clasificación:

Phylum	: Nematode
Orden	: Tylenchida
Sub orden	: Tylenehina
Super familia	: Hetero deroidea
Familia	: Heteroderidae
Género	: <i>Meloidogyne</i>
Especie	: <i>incognita</i>
Nombre científico	: <i>Meloidogyne incognita</i>
Nombre común	: “Nemátodo del nódulo de la raíz”

1.3.2. Distribución mundial de *Meloidogyne*.

La amplia distribución del material vegetal infectado por el nemátodo dificulta distinguir entre las especies nativas de una región y ya adaptadas desde hace tiempo para vivir allí, especies importadas adaptadas a un clima y capaces de existir indefinidamente, y especies importadas capaces de sobrevivir solo unos cuantos meses o unos cuantos años (Taylor & Sasser, 1983).

1.3.3. Morfología.

a. Ciclo de Vida Pre-parasítico.

El ciclo de vida de las especies de *Meloidogyne* comienza con un huevo, generalmente en estado unicelular, depositado por una hembra que está completa o parcialmente incrustada en una raíz del hospedero. Los huevos son depositados en una matriz gelatinosa que los mantiene juntos en masas o sacos de huevos. El desarrollo del huevo comienza breves horas después de la ovoposición, resultando en 2; 4; 8 ó más células, hasta que se ve una larva completamente formada, con un estilete, enrollada en la membrana del huevo (Taylor & Sasser, 1983).

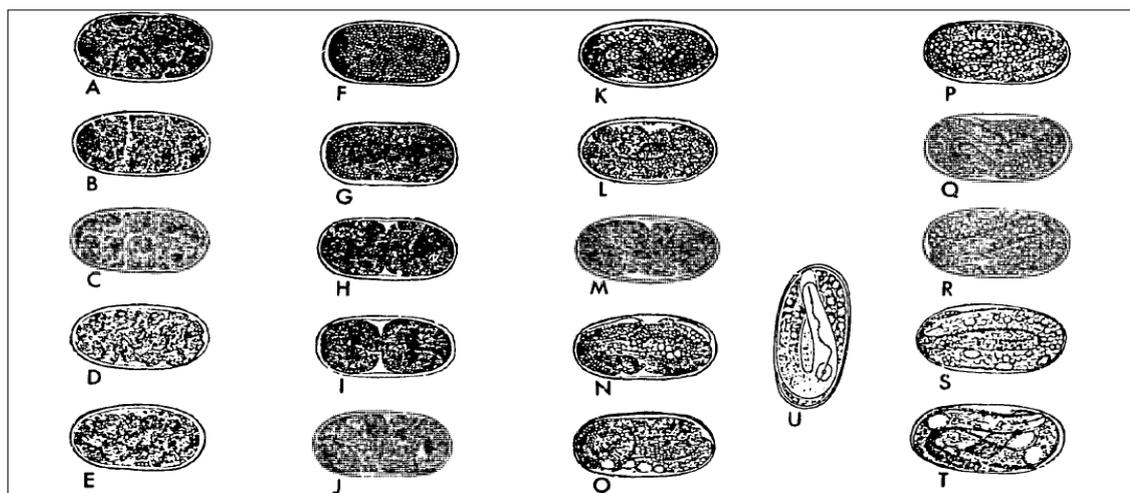


Figura 1: Desarrollo de los huevos de una especie de *Meloidogyne*. A-S: Estadios de desarrollo desde una célula al segundo estadio larval. T: Segundo estadio larval. U: Segundo estadio larval mostrando la muda de cutícula (Taylor & Sasser, 1983).

b. Ciclo de Vida Parasítico.

Las larvas en el segundo estadio larval infectivo generalmente penetran en la raíz justamente sobre la caliptra (punta de la raíz). Se mueven principalmente entre las células no diferenciadas de la raíz y, finalmente, se colocan con sus cabezas en el cilindro central en desarrollo, cerca de la región de elongación celular, y con sus cuerpos en la corteza. Con sus estiletes perforan las paredes de las células e inyectan

secreciones de sus glándulas esofágicas. Estas secreciones causan un agrandamiento de las células en el cilindro vascular y aumentan la proporción de la división celular en el periciclo, dando lugar a la formación de células gigantes (Taylor & Sasser, 1983).

c. *Morfología adultos.*

Los nemátodos adultos macho y hembra son fáciles de distinguir morfológicamente. Los machos son vermiformes mientras que las hembras tienen forma de pera (Agrios, 2005). La longitud promedio de las hembras adultas de las especies de *Meloidogyne* fluctúa alrededor de 0,44 a 1,3 mm y el ancho promedio fluctúa entre 0,325 y 0,7 mm (Taylor & Sasser, 1983).

d. *Reproducción.*

El sistema reproductivo de la hembra consiste en dos ovarios, cada uno con una zona germinal, zona de crecimiento, oviducto, espermatoteca y útero. El útero conduce a una vagina común. El sistema reproductivo se forma de un primordio genital de cuatro células del segundo estadio larval y se desarrolla a través del tercero y cuarto estadios larvales del extremo distal del sistema reproductivo adulto. El esperma no es necesario para el desarrollo del huevo y no ocurre fertilización, aun cuando la espermatoteca contiene esperma (Taylor & Sasser, 1983).

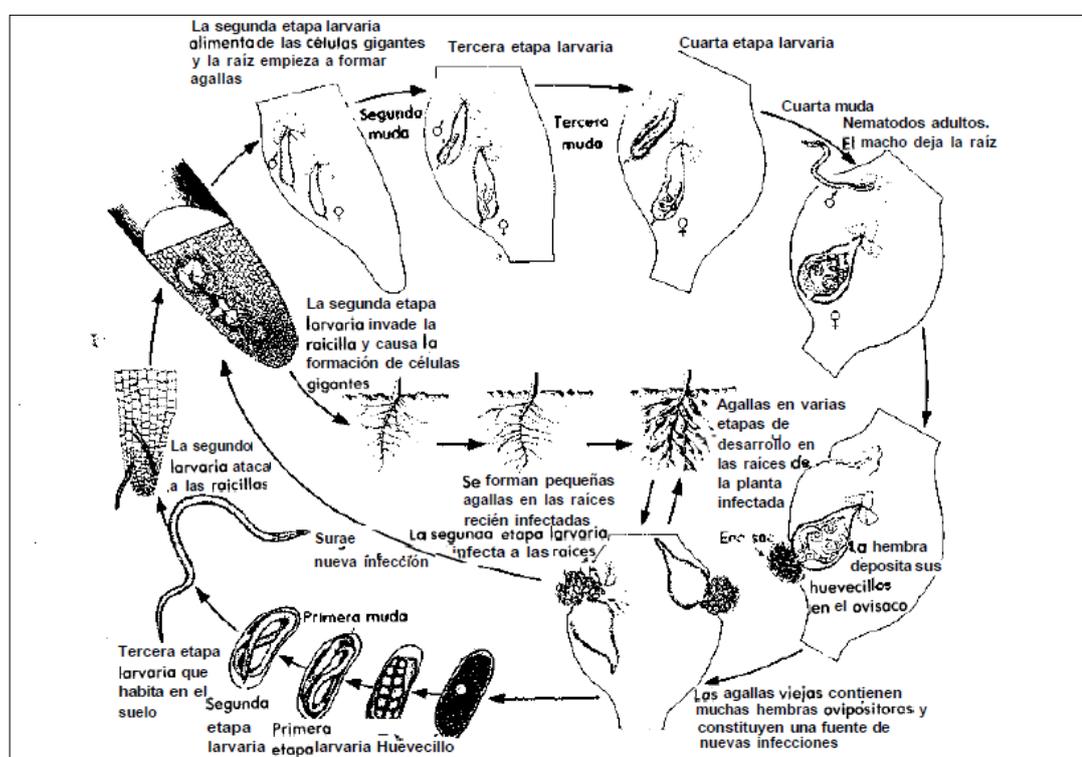


Figura 2: Ciclo patológico del nódulo de la raíz producida por los nemátodos del género *Meloidogyne* (Agrios, 2005).

1.3.4. Sintomatología

Las plantas infectadas por *Meloidogyne* spp, muestran síntomas en los órganos aéreos similares a los producidos por enfermedades radiculares, disminuyendo el volumen de agua disponible para la planta; mostrando un desarrollo deficiente, menor cantidad de hojas pequeñas, amarillamiento, marchitamientos; los frutos y las inflorescencias se atrofian reduciendo la producción (Torres, 2003; Agrios, 2005).

Los síntomas más característicos de la enfermedad son los que aparecen sobre los órganos subterráneos de las plantas. Las raíces infectadas se hinchan en la zona de invasión y desarrollan las agallas típicas del nódulo de la raíz, las cuales tienen un diámetro dos o tres veces mayor al de las raíces sanas (Agrios, 2005).

1.3.5. Control de *Meloidogyne* sp.

En primer lugar, es necesaria la prevención de la entrada del nemátodo, pues una vez éste se ha establecido es virtualmente imposible erradicarlo, por lo que es importante el uso de semilla y plántones certificados y material limpio de nemátodos. Aquellas parcelas en las que se encuentre *Meloidogyne* deberían mantenerse al margen de la producción agrícola por un periodo entre 2 y 4 años. Las malas hierbas deben ser eliminadas para evitar que sirvan como hospedadores alternativos a los nemátodos (Talavera, 2003).

a. Control biológico.

Dos tipos de hongos matan nemátodos: atrapadores de nemátodos y parásitos endozoicos. Los hongos atrapadores capturan a los nemátodos por medio de redes adhesivas, nudos adhesivos adheridos a las redes de hifas por ramas laterales cortas, y anillos hifales. Entre los géneros de hongos, algunos de los más conocidos son *Arthrobotrys*, que tiene anillos contráctiles y redes adhesivas, y *Dactylella*, que son nudos y argollas adhesivas. Los hongos atrapadores de nemátodos aparentemente producen una toxina que mata el nemátodo (Taylor & Sasser, 1983).

1.4. Hongos endofíticos

La palabra ‘endófito’ etimológicamente significa “dentro de la planta” (*endon*: dentro, *phyton*: planta). En un principio, el término endófito se refería a cualquier organismo que colonizara el interior de los tejidos de las plantas, pero fue Wilson en 1995, citado por (Sánchez, Sánchez, Sandoval, Ulloa, Armendáriz, García & Macías, 2013), quien restringió

el término únicamente a microorganismos, refiriéndose sólo a bacterias y a hongos que no provocan daño aparente a la planta hospedera. Actualmente, este término se refiere a bacterias, hongos, algas e insectos, en donde los hongos son los microorganismos que se han aislado con mayor frecuencia como endófitos (Sánchez *et al.*, 2013).

Son organismos inherentes a las plantas que establecen una asociación específica con su hospedero para mutuo beneficio. Existen sin número de especies vegetales de importancia económica que interactúan con especies de hongos endófitos. La planta provee al hongo alimento, hospedaje y protección; por su parte, aunque no hay certeza sobre los mecanismos de acción, los endófitos confieren gran potencial adaptativo a las especies vegetales hospederas frente a condiciones adversas que generen estrés, ya sean de tipo abiótico (salinidad, acidez) o biótico (ataque de plagas) (Abello & Kelemu, 2006).

Estudios recientes demuestran la enorme capacidad que tienen los hongos endófitos para producir compuestos activos que le confieren protección a su hospedera contra el ataque de patógenos y herbívoros, constituyendo una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura y en la medicina (Sánchez *et al.*, 2013).

1.4.1. Clasificación.

Los hongos endófitos son un grupo muy diverso y polifilético que habitan en diversas partes de las plantas. La mayoría pertenece al phylum Ascomycota, aunque también se han encontrado en los Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota (Sánchez *et al.*, 2013).

Históricamente los hongos endófitos se han clasificado en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, basados en su filogenia e historia de vida (Kusari, Hertweck & Michael, 2012; Arnold, Mejía, Kylo, Rojas, Maynard, Robbins & Herre, 2003). Los Clavicipitáceos son los endófitos que colonizan los pastos, mientras que los no Clavicipitáceos colonizan las plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas (Rodríguez, White, Arnold & Redman, 2009).

Existen diversos estudios relativos a los hongos endófitos de las zonas templadas, no obstante, la información sobre los endófitos de zonas tropicales aún representa un objeto potencial de estudio, ya que se tiene información muy limitada al respecto. Asimismo, se conoce relativamente poco de la naturaleza de la interacción entre las plantas leñosas y sus endófitos foliares, a pesar de su abundancia y gran diversidad,

particularmente en regiones tropicales, donde se ha planteado que cada hoja representa un mosaico de diversas especies de hongos endófitos (Sánchez *et al.*, 2013).

1.4.2. Relación hongo endófito – planta hospedera.

La relación entre los hongos endófitos y su planta hospedera puede ir desde el mutualismo hasta la patogénesis. En estas relaciones ambos organismos producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos. El hongo endófito produce factores de virulencia, como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos, mientras que la planta produce defensas, tanto mecánicas como bioquímicas (Sánchez *et al.*, 2013).

Sánchez *et al.*, (2013), menciona que los hongos endófitos pueden contribuir a la protección de su hospedera contra factores bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (estrés salino, térmico, presencia de metales, etc.), por medio de tres mecanismos:

- a. Directos: por medio de enzimas y/o metabolitos secundarios con actividad anti-patógeno, producidos directamente por el hongo endófito.
- b. Indirectos: consisten en la inducción o incremento de la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos intrínsecos a su planta hospedera.
- c. Ecológicos: se llevan a cabo por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y predación.

1.4.3. Metabolitos secundarios derivados de hongos endófitos.

En la literatura se encuentra reportado un número considerable de compuestos de origen policétido, muchos consisten en macrólidos, así como en diversos compuestos aromáticos como bencenos, naftalenos, antracenos, piranos, furanos, benzofuranos, cromanos, xantanos, oxepanos y dépsidos (Kusari *et al.*, 2012).

Un estudio realizado con el endófito *Clonostachys rosea* indica que también es eficiente en el control biológico de nemátodos, principalmente de las clases *Meloidogyne*. El hongo puede producir dos tipos de enzimas proteasas y quitinasas que son fundamentales para el antagonismo. Además, el hongo puede causar impresión directamente en la cutícula del nemátodo después de la formación del apressório (Moreira, França, Vitorino Borges & Maffia, 2014). Mientras que Mousa & Raizada, (2013) evaluaron clases diversas de metabolitos secundarios producidos por diversos hongos endófitos anti-microbianos, como *Trichoderma harzianum*, *Xylaria* sp, *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium lolii*, *Pestalotiopsis adusta*, *Pestalotiopsis fici*, *Acremonium zeae*, *Pestalotiopsis theae*, *Pestalotiopsis adusta*, *Acremonium* sp; entre

otros, sintetizaron terpenoides, alkaloides, phenyl propanoides, compuestos de aliphatic, polyketides, y péptidos.

Una de las grandes ventajas que representa la disponibilidad de un sin número de microorganismos endófitos capaces de sintetizar un fármaco o un agroquímico potencial, es evitar la necesidad de cultivar o coleccionar especies vegetales silvestres, así como reducir el costo de producción de los principios activos (Sánchez *et al.*, 2013). De la misma forma, se ha propuesto que estos metabolitos podrían ser utilizados para desarrollar agroquímicos de origen natural, que serían menos perjudiciales para el hombre y para el medio ambiente que los compuestos químicos sintéticos que actualmente se utilizan en la agricultura, ya que los productos naturales pueden interactuar con blancos moleculares específicos, afectar procesos fisiológicos particulares y presentar menores índices de bioacumulación (Strobel, Daisy, Castillo & Harper, 2004).

1.4.4. Parasitismo de hongos endofíticos.

El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extra-celulares tales como quitinasas, celulasas, (1,3-1,3-glucanasas y proteasas que lisan las paredes de las hifas, conidios o esclerotos). Los ejemplos más conocidos de hongos hiperparásitos son *Trichoderma* y *Clonostachys* (Vero & Mondino, 1999). Ambos ejercen su acción mediante varios mecanismos entre los que juega un rol importante el parasitismo. Hongos del género *Trichoderma* han sido muy estudiados como antagonistas de patógenos de suelos como *Rizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotium cepivorum* y existen varias formulaciones comerciales desarrolladas a partir de ellos (Vero & Mondino, 1999).

1.4.5. Características de los hongos endofíticos.

a. *Trichoderma* sp.

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794 (Martínez, Infante & Reyes, 2013), las especies pertenecientes a este género pertenecen al filo Ascomycota (Familia: Hypocreaceae) y se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo

que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica (Infante, Martínez, González & Reyes, 2009).

Las especies de este género son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores, siendo fundamentalmente tres tipos de mecanismos por los cuales desplazan al fitopatógeno: competición directa por el espacio o por los nutrientes, producción de metabolitos antibióticos y parasitismo directo (Rey, Delgado, Rincón, Limón & Benítez, 2000).

Las especies de *Trichoderma* pasan por cuatro etapas para que se dé el proceso de micoparasitismo, dependiendo de los hongos involucrados, de la acción biotrófica o necrotrófica del antagonista y de las condiciones ambientales, estas son: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento y actividad lítica, el micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, mostrando síntomas de disgregación (Infante *et al.*, 2009). Diferentes interacciones hifales están involucradas en el micoparasitismo, tales como: enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis (Martínez *et al.*, 2013).

Se identificaron compuestos del tipo de las alquilpironas (6- β -pentil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichozianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina), como metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* spp, (Martínez *et al.*, 2013).

b. *Clonostachys* sp.

El género *Clonostachys*, antes se clasificó como *Gliocadium*, pertenece al filo Ascomycota (Familia: Bionectriaceae) y produce conidios unicelulares en conidióforos de dos tipos, penicilado y verticilado. Las colonias del hongo en medio próspero generalmente son blancas, naranjas o salmónes. Las especies del género son generalmente organismos cosmopolitas, presente naturalmente en áreas templadas, tropicales y desérticas. Colonizando raíces, tallos, hojas y semillas de algunas especies de plantas y tener la capacidad endófito de quedarse (Moreira *et al.*, 2014).

Los estudios como antagonista se concentran principalmente en dos aspectos como controlador de hongos fitopatogénicos, mediante la competición por nutrientes y espacio o por micoparasitismo (Moreira *et al.*, 2014). El potencial de uso del antagonista no se limita solo al control de las enfermedades fúngicas, sino que *Clonostachys* sp, es también eficiente en el control biológico de nemátodos, principalmente de la clase *Meloidogyne* sp, *Heterodera* spp, *Globodera* spp, el hongo puede pasar por una esponja de huevos y puede producir dos tipos de enzimas, proteasas y quitinasas, que son fundamental para el antagonismo (Morgan & Rodríguez, 1986). Además, el hongo puede causar impresión directamente en la cutícula del nemátodo después de la formación del apressório. Las conidias del antagonista se adhieren a la cutícula del nemátodo llevando a la inmovilización y más tarde, a la muerte, generando adicionalmente en el cuerpo del nemátodo la producción intensa de micélio y esporas (Moreira *et al.*, 2014).

Siendo la especie *Clonostachys rosea*, anteriormente conocido como *Gliocladium roseum*, la más conocida, principalmente por su capacidad de control biológico, aunque también se ha descrito comportamiento sapotrófico y entomopatógenos (Martin ten Hoopen, 2010).

c. *Xylaria* sp.

Xylariaceae es una familia grande ascomycota con 35 géneros, relativamente bien conocida encontrándose en la mayoría de los países. Se caracteriza por su ascocarpo teniendo paráfisis peritecios que están incrustados en un estroma. Especies de *Xylaria* son saprófitos o, a veces débilmente parasitarios en gran medida de las plantas leñosas y suelen tener estromas alargados. A pesar de que se encuentran principalmente en la madera, algunas especies se encuentran en el aserrín, hojas, estiércol o tierra. Especies de *Xylaria* son difíciles de identificar y clasificar todo porque el estroma de una especie a menudo varían mucho en color, tamaño y, a veces en forma general. Hasta ahora, la identificación de especies de hongos se ha hecho principalmente sobre la base de morfología y características microscópicas, pero esto no es adecuado para la diferenciación de especies estrechamente relacionadas de *Xylaria* (Ramesh, Thalavaipandian, Karunakaran & Rajendran, 2012).

El interés reciente en especies de *Xylaria* se ha concentrado en su fitopatogenicidad y su producción de enzimas. Como ejemplos de metabolitos

secundarios producidos son los derivados de ácido succínico, citocalasina, terpenoides y polyketides (Schneider, Anke & Sterner, 1996).

Estudios *in vitro* de hongos endófitos del género *Xylaria* han demostrado la producción masiva de metabolitos activos los cuales también pueden producirse cuando el hongo habita en los tejidos vivos de plantas, incluso se ha demostrado que pueden proteger a su hospedador de necrosis foliar y muerte inducida por algún patógeno. Se han descubierto en *Xylaria* spp, nuevos compuestos y de características únicas como lo son: lactonas, sesquiterpenoides, xilaramida, xilarina, xiloquetales, globoscina y maldoxina, entre otros; la mayoría de los cuales presentan actividad antifúngica, como, por ejemplo, contra el fitopatógeno *Nematos poracoryli* (Mogollón, Moreno, Iturriaga & Taddei, 2013).

d. *Penicillium* sp.

Las especies que incluye el género *Penicillium* son ubicuas, de amplia distribución por todo el mundo y consideradas saprófitas. Pertenecen al filo Ascomycota (Familia: Trichocomaceae) (De Souza, 2010), muchas de ellas viven en suelo o en materia orgánica en descomposición. La estructura que caracteriza a *Penicillium* spp, es el conidióforo que presenta en forma de pincel. A la morfología de esta estructura es a la que debe el nombre el género (del latín *Penicillus*, “pincel pequeño”). Los conidios se presentan en cadenas y son originados a partir de una célula especializada: la fiálide. El conidióforo está unido al micelio mediante el estipe. Entre ésta y las fiálides pueden aparecer diferentes células (Martínez, 2003).

El primer y mayor uso industrial de *Penicillium* spp, ha sido la producción de penicilina. El descubrimiento de este metabolito de *Penicillium notatum* (actualmente *Penicillium chrysogenum*) por Alexander Fleming fue en 1928, otras especies del género *penicillium* son también utilizadas industrialmente para la obtención de enzimas, principalmente, pectinasas, glucosa oxidasa y catalasa (Martínez, 2003).

Los compuestos metabólicos extraídos de *Penicillium* spp, principalmente son, Ácido ciclopiazónico, Ácido penicílico (AP), Citrinina (CIT), Ocratoxina A (OA), Patulina, Penitrems, Roquefortina C, Toxina PR, estas micotoxinas son utilizadas para la medicina humana y animal (Martínez, 2003).

e. *Pestalotiopsis* sp.

Los conidios de *Pestalotiopsis* son generalmente fusiforme, de 5 celdas, con tres celdas marrones a las células mediana fuliginoso y células de los extremos hialina, y con dos o más apéndices apicales que surgen de la célula apical. Aproximadamente se han descrito 220 especies de *Pestalotiopsis*, y muchos de ellos tienen caracteres morfológicos que se superponen en muchos aspectos. Muchos de ellos fueron identificados como una nueva especie sólo en función de su incidencia en las nuevas plantas hospederas (Ai-Rong, Tong & Liang Dong, 2007).

En la actualidad, al menos 23 especies de *Pestalotiopsis* han sido reportadas como endofitos, algunos de los cuales producen metabolitos secundarios con un gran potencial como antimicrobiano y aplicación médica antitumoral. Sin embargo, muchas especies endófitas de *Pestalotiopsis* nunca han sido identificadas debido a la complicación y dificultad en el uso existente de caracteres morfológicos (Ai-Rong *et al.*, 2007).

Un estudio de la diversidad de metabolitos secundarios antimicrobianos producidos por hongos endófitos, señalan los siguientes metabolitos producidos por *Pestalotiopsis* spp, pestalachloride A, Pestalofones C y E, Pestalothol C y Pestalachloride B, reportados en distintas plantas y actuando como antifúngicos de varios fitopatógenos (Mousa & Raizada, 2013).

Otros estudios indican que *Pestalotiopsis microspora*, se comporta como degradador de poliuretano poliéster polímero sintético (PUR), creciendo en PUR como única fuente de carbono tanto en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, mediante una caracterización molecular de esta actividad sugiere que una hidrolasa serina es la responsable de la degradación de PUR. Sugiriendo que los endófitos estudiados son una fuente prometedora de biorremediación (Russell, Huang, Anand, Kucera, Sandoval, Dantzler & Strobel, 2011).

f. *Acremonium* sp.

El género *Acremonium* es un gran género polifilético de aproximadamente 150 especies, pertenecen al filo Ascomycota (Familia: Incertae sedis). El género incluye muchas de crecimiento lento, de estructura sencilla, hongos filamentosos anamórfico, que se encuentran típicamente en materiales de construcción a base de celulosa húmedas que sufren de forma mojado crónicas, morfología característica de este

género es hifas septadas dando lugar a fiálidas aculeate delgados, cónicos que son generalmente unicelulares, o conidióforos débilmente ramificado (Wicklow & Poling, 2009).

Las conidias son de color crema o durazno claro, lisas por la producción de un delicado micelio aéreo corto. Se ven variantes de las conidias blancas, rosadas y gris-amarillas. Microscópicamente, los conidióforos son largos delicados y casi como pelos. Conidios unicelulares elípticos, ovals a cilíndricos dispuestos en cabezuelas irregulares (Koneman & Roberts, 1997).

Una investigación reporta los siguientes metabolitos secundarios, extraídos de *Acremonium* spp, en el grupo de aminas y amidas: peramine, pyrrocidines A y B (Mousa & Raizada, 2013).

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Tipo de investigación

La investigación es de tipo paramétrica y descriptiva (Investigación Básica).

2.2. Nivel de investigación

El nivel de investigación es Descriptiva – Explicativa, ya que se describe y explica el efecto de cepas de hongos endofíticos aislados de sachá inchi y su biocontrol sobre huevos y estadios juveniles de *M. incognita*, en condiciones de laboratorio, dentro del tipo, biotecnología, protección de cultivos, bioprospección y recursos genéticos.

2.3. Diseño de investigación

El diseño de la investigación es experimental, realizado en condiciones de laboratorio, estableciendo experimentos independientes para el estudio de cepas de hongos endofíticos aislados de sachá inchi su biocontrol sobre *M. incognita*.

2.4. Población y Muestra

2.4.1. Población.

La población está conformada por la disponibilidad de hongos endofíticos en la micoteca del Laboratorio de Bioprotección del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP – San Martín), los cuales fueron aislados de plantas de sachá inchi.

2.4.2. Muestra.

La muestra está conformada por 20 cepas de hongos endofíticos, albergando un total de 7 géneros con diferentes cepas.

2.5. Sistema de hipótesis

Ha: Al menos una cepa de hongo endofítico aislado de sachá inchi ejerce biocontrol sobre huevos y estadios juveniles (J2) de *Meloidogyne incognita*, en condiciones de laboratorio.

H0: Ninguna cepa de hongo endofítico aislado de sachá inchi ejerce biocontrol sobre huevos y estadios juveniles (J2) de *Meloidogyne incognita*, en condiciones de laboratorio.

2.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Los datos fueron obtenidos de fuentes primarias y para conseguirlos se utilizaron las siguientes técnicas e instrumentos:

2.6.1. Técnicas.

- Obtención y análisis de datos como: verificación de la micoteca y la disponibilidad de cepas fúngicas, para la selección como posibles antagonistas de *M. incognita*.
- Observacional, como: identificación y reconocimiento de rasgos visuales de cepas fúngicas antagonistas (crecimiento micelial, coloración, etc.).

2.6.2. Instrumentos.

- Ficha de micoteca, con codificación e información del aislamiento.
- Cuaderno de notas.
- Archivo de datos.

2.7. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Se eligió un Diseño completo al azar (DCA) con veinte tratamientos y tres repeticiones para las pruebas de parasitismo de micoendofíticos de sachá inchi al nemátodo del nudo *Meloidogyne incognita* (Tabla 3) y veinte tratamientos con tres repeticiones para determinar el efecto in vitro de extractos fúngicos en tres dosis, dosis baja (50%), media (70%) y alta (90%) sobre la eclosión de huevos y estadios juveniles de *Meloidogyne incognita*, cada dosis con tres repeticiones (Tabla 4), en condiciones de laboratorio. Los datos obtenidos fueron expresados en porcentaje, y para el análisis de variancia y medias usando la prueba de Duncan ($P < 0.01$) se utilizó el paquete estadístico Infostat/Profesional Versión 1.1.

2.8. Métodos

2.8.1. Ubicación del ensayo.

El trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Bioprotección del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP – San Martín). Ubicado en el distrito de Morales, provincia de San Martín, departamento de San Martín, que se encuentra a una Latitud sur: $06^{\circ} 36' 15''$, Longitud oeste: $76^{\circ} 10' 30''$ Altitud de 283 m.s.n.m.m.



Figura 3: Laboratorio de Bioprotección del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP – San Martín). Fotos: Padilla. A. 2015.

2.8.2. Aislamientos de micoendofíticos.

a. Origen de hongos endofíticos de sachá inchi

Fueron colectados por el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, en el marco del proyecto “Generación de tecnologías para el control integrado del nemátodo del nudo (*Meloidogyne incognita*) de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la región San Martín”, se colectaron del tallo y hojas de siete especies de Sachá Inchi (*P. volubilis* L., *P. huayllabambana*, *P. carolis-vegae*, *P. polyadenia*, *P. lorentensis*, *P. brachybotrya* y *Plukenetia* sp), cada una respectivamente georeferenciada (Tabla 1). De los cuales se aislaron siete géneros de micoendofíticos de sachá inchi (Tabla 2). Las cepas fueron conservadas en la Micoteca del laboratorio de Bioprotección del IIAP-San Martín, de la cual fue facilitada para el estudio.

Tabla 1

Origen y ubicación de siete especies de Plukenetia sp.

<i>Plukenetia</i> sp.	Localidad	U. política	U. Geográfica	Propietario
<i>P. carolis-vegae</i>	Sector Monte Alegre	Limabamba, Rodríguez de Mendoza-Amazonas	LS: 6° 35,892" LO: 77° 31,407" A: 1 726 m.s.n.m.m	José Rodríguez Torres Riva
<i>P. volubilis</i>	EE-Bello Horizonte	La Banda de Shilcayo, San Martín-San Martín	LS: 6° 29,46" LO: 76° 21,47" A: 350 m.s.n.m.m	IIAP
<i>P. huayllabambana</i>	Shucush	Longa, Rodríguez de Mendoza-Amazonas	LS: 6° 23,767" LO: 77° 34,175" A: 1 617 m.s.n.m.m	Andrés Alejos Herrera

<i>Plukenetia</i> sp	Shucush	Longa, Rodríguez de Mendoza-Amazonas	LS: 6° 23,767" LO: 77° 34,175" A: 1 617 m.s.n.m.m	Andrés Alejos Herrera
<i>P. brachybotrya</i>	Sector Puerto Almendra	San Juan, Maynas-Loreto	LS: 3° 49,355" LO: 73° 22,325" A: 105 m.s.n.m.m	Fac. Forestales-UNAP
<i>P. loretensis</i>	Puerto Almendra	San Juan, Maynas-Loreto	LS: 3° 49,587" LO: 73° 22,429" A: 110 m.s.n.m.m	Fac. Forestales-UNAP
<i>P. poliadenia</i>	CN Huitoto-Pucaurquillo	Pebas, Ramón Castilla-Loreto	LS: 3° 20,049" LO: 71° 55,123" A: 101 m.s.n.m.m	Hilada Rivera Peña

Fuente: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP-SM), 2014.

Tabla 2

Procedencia y clasificación taxonómica de 20 cepas de hongos endofíticos de sachá inchi.

Género	Código de aislamiento	Procedencia	
		Especie	Órgano
<i>Xylaria</i> sp.	kmd 152 (*)	<i>Plukenetia volubilis</i>	Tallo
<i>Xylaria</i> sp.	kmd 27	<i>Plukenetia</i> sp.	Tallo
<i>Clonostachys</i> sp.	kmd 80	<i>Plukenetia brachybotrya</i>	Tallo
<i>Clonostachys</i> sp.	kmd 84	<i>Plukenetia huayllabambana</i>	Tallo
<i>Clonostachys</i> sp.	kmd 88	<i>Plukenetia carolis-vegae</i>	Tallo
<i>Clonostachys</i> sp.	kmd 116	<i>Plukenetia loretensis</i>	Tallo
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	kmd 102	<i>Plukenetia carolis-vegae</i>	Hoja
<i>Trichoderma</i> sp.	kmd 32	<i>Plukenetia carolis-vegae</i>	Tallo
<i>Trichoderma</i> sp.	kmd 45	<i>Plukenetia</i> sp.	Tallo
<i>Trichoderma</i> sp.	kmd 54	<i>Plukenetia brachybotrya</i>	Tallo
<i>Trichoderma</i> sp.	kmd 62	<i>Plukenetia loretensis</i>	Tallo
<i>Xylaria</i> sp.	kmd 08	<i>Plukenetia poliadenia</i>	Hoja
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	kmd 06	<i>Plukenetia brachybotrya</i>	Hoja
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	kmd 99	<i>Plukenetia poliadenia</i>	Hoja
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	kmd 135	<i>Plukenetia</i> sp.	Tallo
<i>Penicillium</i> sp.	kmd 117	<i>Plukenetia brachybotrya</i>	Hoja
<i>Penicillium</i> sp.	kmd 130	<i>Plukenetia</i> sp.	Tallo
<i>Phyalophora</i> sp.	kmd 17	<i>Plukenetia</i> sp.	Tallo
<i>Phyalophora</i> sp.	kmd 26	<i>Plukenetia</i> sp.	Tallo
<i>Acremonium</i> sp.	kmd 51	<i>Plukenetia</i> sp.	Tallo

Fuente: Aislamiento de hongos endofíticos, procedentes de *Plukenetia* spp, colectados por Kadir Márquez Dávila (Márquez, 2014).

(*) kmd 152: Código colector, Kadir Márquez Dávila, aislamiento 152.

2.8.3. Descripción de tratamientos en estudio.

Tabla 3

Diseño experimental para la prueba de parasitismo de micoendofíticos de sachá inchi al nemátodo del nudo Meloidogyne incognita.

Tratamientos	Descripción (*)
T0 - Control	Suelo estéril + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T1 - <i>Xylaria</i> sp.	XYL-E-152 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T2 - <i>Xylaria</i> sp.	XYL-E-27 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T3 - <i>Clonostachys</i> sp.	CLO-E-80 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T4 - <i>Clonostachys</i> sp.	CLO-E-84 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T5 - <i>Clonostachys</i> sp.	CLO-E-88 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T6 - <i>Clonostachys</i> sp.	CLO-E-116 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T7 - <i>Pestalotiopsis</i> sp.	PES-E-102 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T8 - <i>Trichoderma</i> sp.	TRI-E-32 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T9 - <i>Trichoderma</i> sp.	TRI-E-45 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T10 - <i>Trichoderma</i> sp.	TRI-E-54 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T11 - <i>Trichoderma</i> sp.	TRI-E-62 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T12 - <i>Xylaria</i> sp.	XYL-E-08 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T13 - <i>Pestalotiopsis</i> sp.	PES-E-06 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T14 - <i>Pestalotiopsis</i> sp.	PES-E-99 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T15 - <i>Pestalotiopsis</i> sp.	PES-E-135 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T16 - <i>Penicillium</i> sp.	PEN-E-117 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T17 - <i>Penicillium</i> sp.	PEN-E-130 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T18 - <i>Phyalophora</i> sp.	PHY-E-17 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T19 - <i>Phyalophora</i> sp.	PHY-E-26 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T20 - <i>Acremonium</i> sp.	ACRE-E-51 (Esporas) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>

(*) Descripción: XYL-E-152 (*Xylaria* endófito 152); XYL-E-27 (*Xylaria* endófito 27); CLO-E-80 (*Clonostachys* endófito 80); CLO-E-84 (*Clonostachys* endófito 84); CLO-E-88 (*Clonostachys* endófito 88); CLO-E-116 (*Clonostachys* endófito 116); PES-E-102 (*Pestalotiopsis* endófito 102); TRI-E-32 (*Trichoderma* endófito 32); TRI-E-45 (*Trichoderma* endófito 45); TRI-E-54 (*Trichoderma* endófito 54); TRI-E-62 (*Trichoderma* endófito 62); XYL-E-08 (*Xylaria* endófito 08); PES-E-06 (*Pestalotiopsis* endófito 06); PES-E-99 (*Pestalotiopsis* endófito 99); PES-E-135 (*Pestalotiopsis* endófito 135); PEN-E-117 (*Penicillium* endófito 117); PEN-E-130 (*Penicillium* endófito 130); PHY-E-17 (*Phyalophora* endófito 17); PHY-E-26 (*Phyalophora* endófito 26) y ACRE-E-51 (*Acremonium* endófito 51).

Tabla 4

Diseño experimental para determinar el efecto in vitro de extractos fúngicos en tres dosis, dosis baja (50%), media (70%) y alta (90%) sobre la eclosión de huevos y estadios juveniles de Meloidogyne incognita, cada dosis con tres repeticiones.

Tratamientos	Descripción (*)
T0 - Control	Agua destilada estéril + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T1 - <i>Xylaria</i> sp.	XYL-E-152 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T2 - <i>Xylaria</i> sp.	XYL-E-27 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T3 - <i>Clonostachys</i> sp.	CLO-E-80 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T4 - <i>Clonostachys</i> sp.	CLO-E-84 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T5 - <i>Clonostachys</i> sp.	CLO-E-88 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T6 - <i>Clonostachys</i> sp.	CLO-E-116 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T7 - <i>Pestalotiopsis</i> sp.	PES-E-102 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T8 - <i>Trichoderma</i> sp.	TRI-E-32 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T9 - <i>Trichoderma</i> sp.	TRI-E-45 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T10 - <i>Trichoderma</i> sp.	TRI-E-54 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T11 - <i>Trichoderma</i> sp.	TRI-E-62 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T12 - <i>Xylaria</i> sp.	XYL-E-08 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T13 - <i>Pestalotiopsis</i> sp.	PES-E-06 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T14 - <i>Pestalotiopsis</i> sp.	PES-E-99 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T15 - <i>Pestalotiopsis</i> sp.	PES-E-135 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T16 - <i>Penicillium</i> sp.	PEN-E-117 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T17 - <i>Penicillium</i> sp.	PEN-E-130 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T18 - <i>Phyalophora</i> sp.	PHY-E-17 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T19 - <i>Phyalophora</i> sp.	PHY-E-26 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>
T20 - <i>Acremonium</i> sp.	ACRE-E-51 (Extracto fúngico) + Huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>

(*) Descripción: XYL-E-152 (*Xylaria* endófito 152); XYL-E-27 (*Xylaria* endófito 27); CLO-E-80 (*Clonostachys* endófito 80); CLO-E-84 (*Clonostachys* endófito 84); CLO-E-88 (*Clonostachys* endófito 88); CLO-E-116 (*Clonostachys* endófito 116); PES-E-102 (*Pestalotiopsis* endófito 102); TRI-E-32 (*Trichoderma* endófito 32); TRI-E-45 (*Trichoderma* endófito 45); TRI-E-54 (*Trichoderma* endófito 54); TRI-E-62 (*Trichoderma* endófito 62); XYL-E-08 (*Xylaria* endófito 08); PES-E-06 (*Pestalotiopsis* endófito 06); PES-E-99 (*Pestalotiopsis* endófito 99); PES-E-135 (*Pestalotiopsis* endófito 135); PEN-E-117 (*Penicillium* endófito 117); PEN-E-130 (*Penicillium* endófito 130); PHY-E-17 (*Phyalophora* endófito 17); PHY-E-26 (*Phyalophora* endófito 26) y ACRE-E-51 (*Acremonium* endófito 51).

Tabla 5

Concentraciones de solución (extracto fúngico) y solución (huevos y estadios juveniles de Meloidogyne incognita) en tres dosis.

Concentración	Descripción
Control (*)	Solución (agua destilada estéril) más solución (huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>)
Baja (50%)	50% de solución (extracto fúngico) más 50% de solución (huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>)
Media (70%)	70% de solución (extracto fúngico) más 30% de solución (huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>)
Alta (90%)	90% de solución (extracto fúngico) más 10% de solución (huevos y J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>)

(*) Control: Cada dosis (baja, media y alta) tuvo un control, con tres repeticiones.

2.8.4. Prueba de determinación del efecto parasítico de hongos endofíticos de sachá inchi a huevos y estadios juveniles de *Meloidogyne incognita*.

a. Reactivación e incremento de cepas de hongos endofíticos.

Se reactivaron todas las cepas presentes en la Tabla 2, que se encuentran conservadas en la Micoteca del IIAP – San Martín, fueron reactivadas en placas de Petri 15 x 60 mm que contiene medio PSAO (papa sacarosa agar más antibiótico oxitetraciclina), para ello se extrajo una porción de agar con el micelio del hongo de los viales y se transfirió a cada placa en condiciones asépticas. Las placas se dejaron en incubación a temperatura ambiente entre 5 a 10 días (según el género). Para el incremento de inóculo se volvió a reactivar las cepas de la misma manera, tratando de mantener las cepas en condiciones óptimas de esporulación, cada 20 días después de haber sido repicadas como máximo y una copia fue conservada a -20°C de temperatura en viales que contienen solución Glicerol al 20%.



Figura 4: Proceso de reactivación de cepas. 1) preparación de medio de cultivo PSA. 2) esterilización de materiales. 3) plaqueo de medio PSA + O en placas de de Petri de 15 x 60 mm. 4) viales conservados conteniendo micelio de los aislamientos. 5) extracción de agar conteniendo micelio de los aislamientos. 6) siembra de micelio en placas conteniendo medio PSA + oxitetraciclina. Fotos: Padilla. A. 2015.

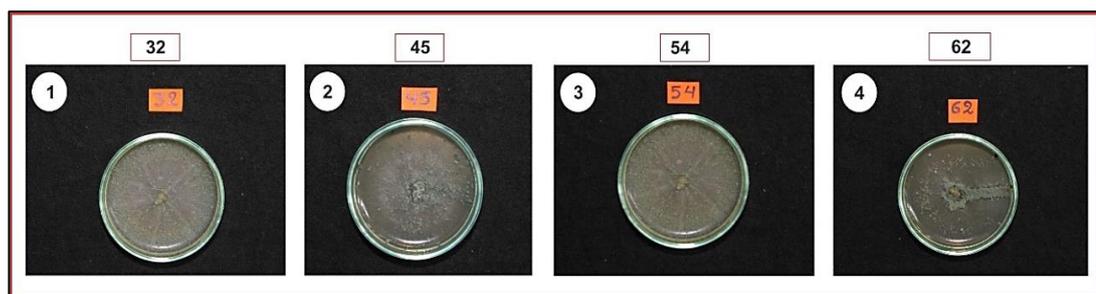


Figura 5: Cepas desarrolladas de *Trichoderma* sp: 1) aislamiento 32; 2) aislamiento 45; 3) aislamiento 54; 4) aislamiento 62. Fotos: Padilla. A. 2015.

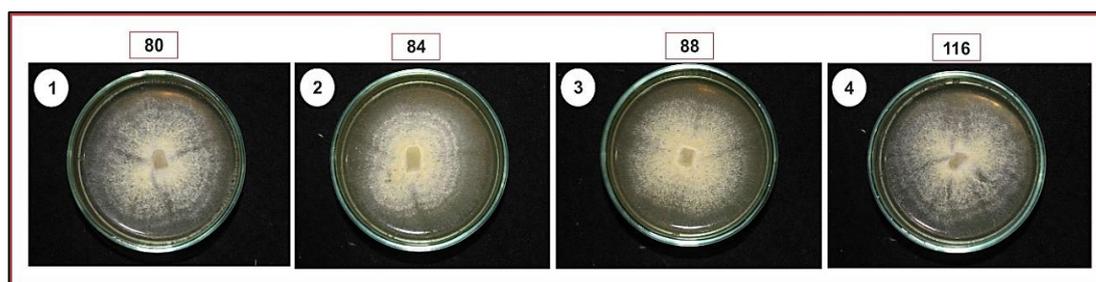


Figura 6: Cepas desarrolladas de *Clonostachys* sp: 1) aislamiento 80; 2) aislamiento 84; 3) aislamiento 88; 4) aislamiento 116. Fotos: Padilla. A. 2015.

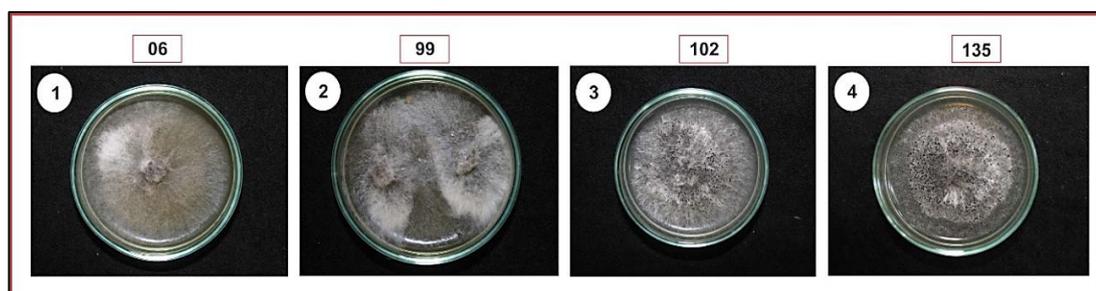


Figura 7: Cepas desarrolladas de *Pestalotiopsis* sp: 1) aislamiento 06; 2) aislamiento 99; 3) aislamiento 102; 4) aislamiento 135. Fotos: Padilla. A. 2015.

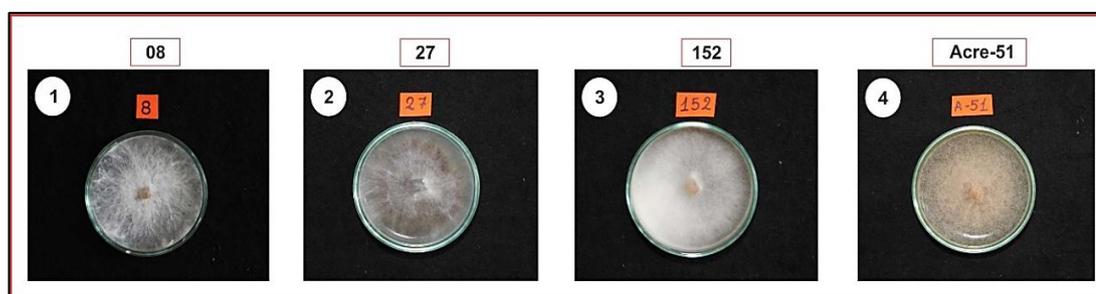


Figura 8: Cepas desarrolladas: 1, 2 y 3 (aislamientos 08; 27 y 152 de *Xylaria* sp), 4 (aislamiento 51 de *Acremonium* sp). Fotos: Padilla. A. 2015.

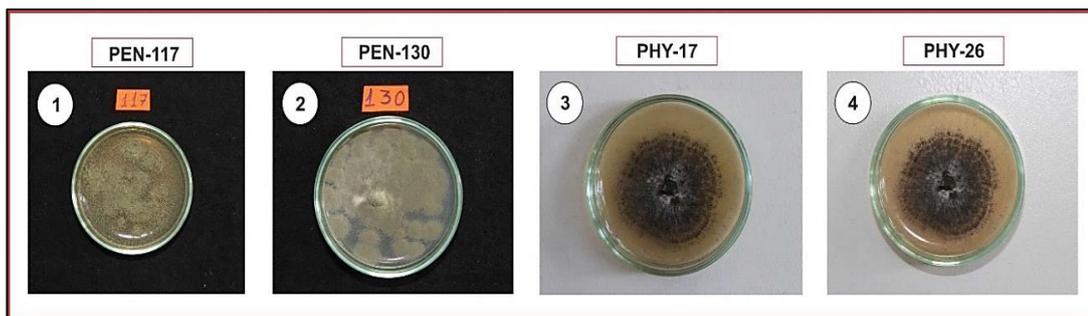


Figura 9: Cepas desarrolladas: 1 y 2 (aislamientos 117 y 130 de *Penicillium* sp); 3 y 4 (aislamientos 17 y 26 de *Phyalophora* sp). Fotos: Padilla, A. 2015.



Figura 10: Proceso de conservación de cepas: 1) preparación de glicerol al 20%. 2) esterilización de materiales. 3) aislamiento desarrollado para su conservación. 4) realización de cortes longitudinales al medio de cultivo conteniendo micelio del aislamiento. 5) extracción y puesta de pequeños trozos de agar conteniendo micelio en viales, para su posterior conservación a -20°C en una refrigeradora. Fotos: Padilla, A. 2015.

b. Obtención y esterilización de suelo.

El suelo empleado para esta prueba fue suelo agrícola, recolectado del centro experimental Pucayacu del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), ubicado en el centro poblado menor de Bello Horizonte a 7 Km. de la ciudad de Tarapoto. Para la esterilización se acondicionó el suelo en bolsas de polipropileno de 10 x 15 pulgadas y se sometió en autoclave a temperatura de 121°C , 15 Libras de presión por un tiempo de 45 minutos.



Figura 11: Esterilización de suelo. Foto: Padilla. A. 2015.

c. Preparación de fuente de inóculo de hongos endofíticos de sachá inchi.

Las conidias de hongos endofíticos fueron cosechadas de entre 5 a 10 días de edad (según los géneros) que crecieron a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) sobre Papa Sacarosa Agar más oxitetraciclina (PSAO). Las conidias fueron cosechadas incorporando 10 ml de agua destilada estéril (ADE) sobre la superficie de la masa de conidias y agitado con un varilla de vidrio estéril. La suspensión fue transferida a un vaso de prueba estéril y se transfirió 1 ml de esta suspensión a tubos ependorf de 2 ml para facilitar el manipuleo al momento de la cuantificación. En un hematocimetro se cuantificó la concentración de conidias y expresadas en unidades formadoras de colonia por centímetro cúbico (ufc.cc), se homogenizó la concentración mediante diluciones hasta obtener 1×10^6 ufc.cc por cada aislamiento.



Figura 12: Proceso de obtención de fuente de inóculo de hongos endofíticos de sachá inchi: 1) aislamiento de hongo endófito de sachá inchi. 2) incorporación de agua destilada estéril (ADE) y agitación de la masa de conidias. 3) transferencia de contenido a un vaso de prueba estéril. 4) transferencia de 1ml de esta suspensión a tubos ependorf. 5) cuantificación de conidias. 6) conidias de *Clonostachys* sp, foto tomada en un microscopio invertido. Fotos: Padilla. A. 2015.

d. Obtención de inóculo de *Meloidogyne incognita*.

Se colectaron raíces de plantas de tomate (*Lycopersicon sculentum*) con nódulos, infestados por el nemátodo *Meloidogyne incognita* (Márquez *et al.*, 2013). Las raíces fueron lavadas con agua de caño, cortando aquellas que tengan nódulos en trozos de aproximadamente 2 cm de longitud. Los trozos de tejido fueron rotas con ayuda de un pilón de madera y estas se incorporaron a una botella de vidrio que contiene solución de hipoclorito de sodio al 5% por un minuto en agitación (manualmente) constante. Después se tamizó y lavó con agua destilada estéril (ADE). Se utilizaron tamices de 170, 230 y 400 mesh. Los huevos y los individuos juveniles (J2) del nemátodo atrapados en el tamiz de 400 mesh, fueron colectados con ayuda de una pizeta y transferidos a un vaso de prueba de 100 ml. Con ayuda de un microscopio compuesto se cuantificó la concentración de huevos, para ello se tomó una alícuota de 3 ml de la suspensión de huevos y J2, transfiriendo el contenido a una placa de conteo, expresando el resultado en huevos por centímetro cúbico (h.cc).

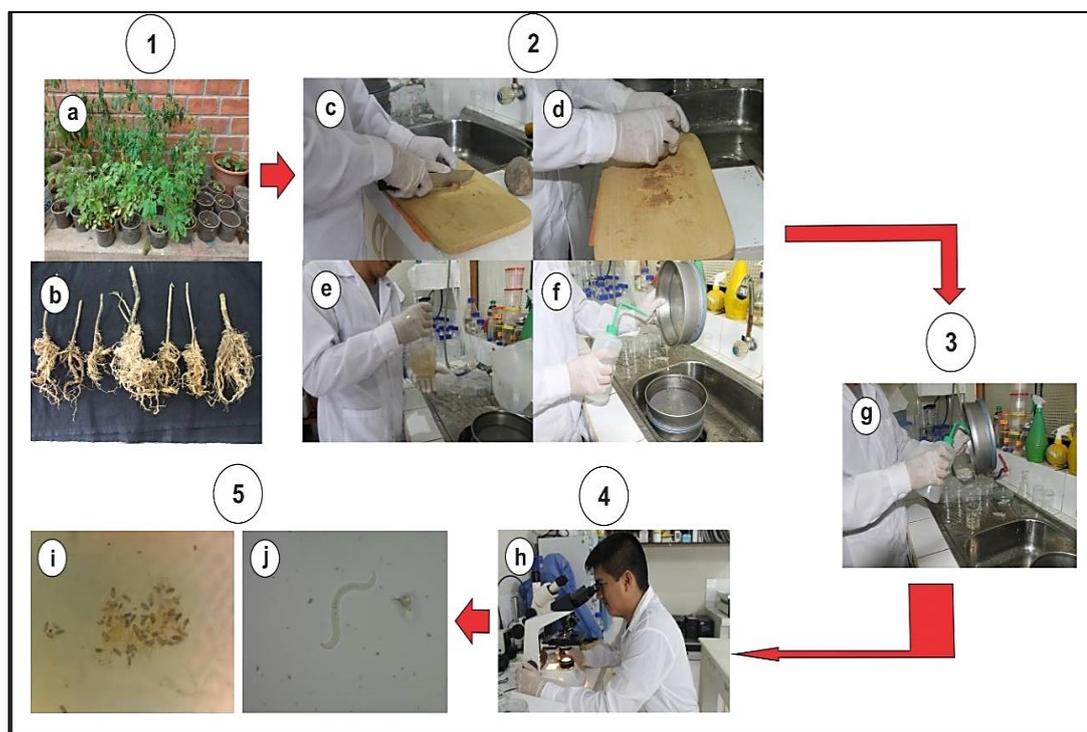


Figura 13: Proceso de obtención de fuente de inóculo de *Meloidogyne incognita*: 1) **a.** plantas de tomate, como fuente de inóculo de *M. incognita*; **b.** raíces con presencia de nódulos. 2) **c.** corte de raíces en aproximadamente 2 cm de longitud; **d.** trituración de raíces; **e.** agitación de raíces; **f.** tamizado de raíces. 3) **g.** puesta de suspensión líquida de nemátodos en un vaso de prueba. 4) **h.** conteo de huevos y juveniles de *M. incognita*. 5) **i.** presencia de huevos; **j.** presencia de estadios juveniles. Fotos: Padilla. A. 2015.

e. Infestación del suelo con hongos endofíticos de sachá inchi e inoculación de huevos de *Meloidogyne incognita*.

Se trabajó en placas de Petri de 90 x 15 mm, distribuyendo 50 g de suelo estéril y se inoculó con suspensión de conidias de hongos endofíticos de sachá inchi a una concentración de 1×10^6 ufc.cc por gramo de suelo. En caso de los géneros *Pestalotiopsis* sp, *Xylaria* sp, *Phyalophora* sp, y *Acremonium* sp, no se inoculó con conidias ya que se extrajeron pequeñas porciones de agar conteniendo el micelio de cada cepa colocando 5 trocitos por placa, luego cada placa de Petri fue puesta en bolsas de polipropileno de 10 x 15 pulgadas dejando incubar a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) durante cinco días. Seguidamente se inoculó 500 huevos de *Meloidogyne incognita* por placa; dejando en incubación a temperatura ambiente entre 25 y 27°C , durante 4; 8; 12 y 16 días después.



Figura 14: Proceso de inoculación del suelo con hongos endofíticos de sachá inchi y huevos de *Meloidogyne incognita*: 1) pesado de suelo (50 g). 2 y 3) inoculación de suelo con hongos endofíticos. 4) embolsado de placas conteniendo suelo estéril + hongos endofíticos. 5) inoculación de suelo con huevos de *Meloidogyne incognita*. Fotos: Padilla. A. 2015.

f. Evaluación de parasitismo de hongos endofíticos de sachá inchi sobre huevos y estadios juveniles de *Meloidogyne incognita*.

Para realizar la evaluación de parasitismo de hongos endofíticos se extrajeron Juveniles (J2) de *Meloidogyne incognita* del suelo de la prueba en placas, mediante el método de la bandeja, para lo cual se acondicionó tamices de PVC, posteriormente se cubrió cada tamiz con papel toalla y se añadió el suelo de cada placa al mismo tiempo que se puso sobre bandejas evitando que entren en contacto con la base de estas, se

agregó agua destilada a nivel del suelo, dejando reposar por 1 día para facilitar la sedimentación de los nemátodos. Pasado este tiempo se retiró los tamices con el suelo y se pasó la solución (agua + nemátodos) por dos tamices de 230 y 400 mesh, la muestra colectada en el tamiz de 400 mesh, fue transferida con una pizeta a un vaso de prueba para realizar la evaluación mediante el microscopio compuesto, donde se contó el número de J2 existentes en cada placa.



Figura 15: Proceso de evaluación de parasitismo de hongos endofíticos sobre *M. incognita*: 1) tamiz de PVC. 2) extracción de nemátodos. 3) tamizado de muestras. 4) conteo de juveniles. Fotos: Padilla. A. 2015.

2.8.5. Prueba del efecto *in vitro* de extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi sobre la eclosión de huevos y estadios juveniles de *Meloidogyne incognita*.

a. Incremento de cepas de hongos endofíticos.

Las cepas presentes en la Tabla 2, se incrementaron en placas de Petri 15 x 60 mm que contiene medio Papa Sacarosa Agar más oxitetraciclina (PSAO), extrayendo una porción de agar con el micelio del hongo y se transfirió a otra placa conteniendo el mismo medio en condiciones asépticas, dejando en incubación a temperatura ambiente entre 5 a 10 días (según el género) y una copia fue conservada a -20°C de temperatura en viales que contienen solución Glicerol al 20%.

b. Preparación de caldo mineral (MIN), medio bajo en nutrientes.

Para ello se necesita una lista de nutrientes para antibiosis (Tabla 6), que se mezcló y diluyó en un litro de agua, esterilizando a 121°C de temperatura, 15 libras de presión por 20 minutos. Para un litro de caldo MIN se necesita 5 g de glucosa, 10 ml de caldo MIN 100x, 1000 ml de agua destilada (AD) y 1 ml de asparagino 1000x, luego con ayuda de una probeta de 100 ml se midió 80 ml de solución y se incorporó en matraces de 125 ml, cubriendo cada matraz con algodón y papel aluminio para posteriormente esterilizar a 121°C de temperatura, 15 libras de presión por 20 minutos en una autoclave vertical.

Tabla 6

MIN medio bajo en nutrientes para antibiosis basado sobre la solución de nutrientes de (Huttermann & Volger, 1973).

Quimicos	Gramos/L	100X
D-glucose	5,000	---
L-asparagine (anhydrous)	0,013	---
KH ₂ PO ₄	1,000	10,000
MgSO ₄	0,300	3,000
KCl	0,500	5,000
FeSO ₄	0,010	0,100
Mn(CH ₂ COO) ₂ · 4H ₂ O	0,008	0,800
Zn(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,002	0,200
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0,050	5,000
CuSO ₄	0,002	0,200
NH ₄ NO ₃	0,008	0,800

c. Producción de extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi.

Las conidias de hongos endofíticos fueron cosechadas de entre 5 a 10 días de edad (según los géneros) que crecieron a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) sobre Papa Sacarosa Agar más oxitetraciclina (PSAO). Las conidias fueron cosechadas incorporando 10 ml de agua destilada estéril (ADE) sobre la superficie de la masa de conidias y agitado con un varilla de vidrio estéril. La suspensión fue transferida a un vaso de prueba estéril y se transfirió 2 ml de esta suspensión a tubos ependorf de 2 ml para facilitar el manipuleo al momento de la cuantificación. En un hematocimetro se cuantificó la concentración y expresadas en unidades formadoras de colonia por centímetro cúbico (ufc.cc), se homogenizó la concentración diluciones hasta obtener 1×10^6 ufc.cc por cada aislamiento, la cual se empleó como inóculo para la siembra en

matraces estériles de 125 ml conteniendo 80 ml de caldo mínimo de sales (minimal salts broth-MIN). Fueron incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y en agitación a 110 rpm durante siete días.

Los extractos fúngicos en cabina de flujo laminar fueron filtrados por un embudo de vidrio con algodón estéril en tubos falcón de 50 ml también estériles, y centrifugados a 5 000 rpm por 10 minutos con la finalidad de precipitar micelios y esporas.



Figura 16: Proceso de producción de extractos fúngicos de microendófitos de sachá inchi: 1) fuente de inóculo conteniendo suspensión líquida de conidias de microendófitos. 2) cuantificación de conidias. 3) matraces en agitación, produciendo metabolitos secundarios. 4) filtración de extractos fúngicos en tubos falcón de 50 ml. 5) aislamiento presentando impurezas. 6) centrifugado a 5 000 rpm. Fotos: Padilla, A. 2015.

d. Obtención de inóculo de *Meloidogyne incognita*.

Se colectaron raíces de plantas de tomate (*Lycopersicon sculentum*) con nódulos, infestados por el nemátodo *Meloidogyne incognita*, a partir de estas se realizó la extracción de huevos mediante el método descrito anteriormente en el numeral 4.2.2.4

e. Efecto de extractos fúngicos de microendófitos de sachá inchi en la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*.

Primeramente, se debe contar con inóculo de *Meloidogyne incognita*. Con ayuda de un microscopio compuesto se cuantificó la concentración de huevos y juveniles, tomando una alícuota de 3 ml de la suspensión líquida, transfiriéndola a una placa de

conteo, expresando el resultado en huevos y juveniles (J2) por centímetro cúbico (h.cc). Inmediatamente después se puso a Baño María a 90°C por una hora a los extractos fúngicos de cada aislamiento que se formuló en tres concentraciones (50%; 70% y 90%) (Tabla 5), poniendo una cantidad de 600 huevos en tubos de ensayo de 150 x 15 mm, sellando cada tubo con papel aluminio, al final cada tubo de ensayo se puso en gradillas e incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).



Figura 17: Proceso del efecto *in vitro* de extractos fúngicos a *Meloidogyne incognita*: 1) cuantificación de huevos y juveniles (J2). 2) extractos fúngicos en el baño maría a 90°C. 3) proceso de puesta de concentraciones de huevos de *Meloidogyne incognita* más extractos fúngicos en tres dosis (50%; 70% y 90%). 4) tubos de ensayo de 150 x 15 mm conteniendo concentraciones de huevos de *Meloidogyne incognita* más extractos fúngicos. Fotos: Padilla. A. 2015.

f. Evaluación del efecto *in vitro* de extractos fúngicos de hongos endofíticos de *sacha inchi* sobre la eclosión de huevos y estadios juveniles de *Meloidogyne incognita*.

Para realizar la evaluación del efecto *in vitro* de micoendofíticos de *sacha inchi* sobre la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*, se formuló tres concentraciones (Tabla 5), donde se inocularon 600 huevos de *Meloidogyne incognita* más extractos fúngicos de micoendofíticos de *sacha inchi*, cada tubo de ensayo se pasó por un bortex y se extrajo con una micropipeta, una alícuota de 3 ml, la muestra fue colocada en una placa de conteo, para luego realizar el conteo de juveniles (J2) y huevos mediante el microscopio compuesto.



Figura 18: Huevo de *Meloidogyne incognita* en inmersión con extractos fúngicos de *Trichoderma* sp; Foto: Padilla. A. 2015.

2.8.6. Variables evaluadas.

a. *Parasitismo de hongos endofíticos de sachá inchi a huevos y estadios juveniles de Meloidogyne incognita.*

El porcentaje de parasitismo de hongos endofíticos de sachá inchi, se determinó tomando el porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* a los 4; 8; 12 y 16 d.d.ex (días después de la exposición), a partir de este dato se determinó el porcentaje de parasitismo de hongos endofíticos a huevos de *Meloidogyne incognita*.

b. *Efecto in vitro de extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi sobre la eclosión de huevos y estadios juveniles de Meloidogyne incognita*

El porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*, se determinó mediante evaluaciones microscópicas, para la cual se tomó alícuotas de 3 ml de las tres concentraciones de extractos fúngicos con huevos de *Meloidogyne incognita*, incubadas en tubos de ensayo. Las evaluaciones se realizaron a los 4; 8; 12 y 16 d.d.in (días después de la inmersión). Las evaluaciones consistieron en el conteo de huevos de *Meloidogyne incognita*.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Parasitismo de hongos endofíticos a huevos de *Meloidogyne incognita* en suelo en condiciones de laboratorio

La Tabla 7 y la Figura 19 muestran el Análisis de Varianza con nivel de significancia al 0,01%, y la prueba de Duncan ($p < 0,01$) respectivamente para el parasitismo de hongos endofíticos aislados de sachá inchi hacia huevos de *M. incognita*, datos transformados a función ASeno ($x/100$).

Tabla 7

Análisis de varianza del promedio de porcentaje de parasitismo de cepas de micoendofíticos de sachá inchi a huevos y estadios juveniles de Meloidogyne incognita, durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.ex), datos transformados a "ASeno (x/100)".

Fuente de variación	G.L	SC	CM	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	20	22,8	1,14	39,4	<0,0001	**
Error	40	1,16	0,03			
Total	60	24				
**= Altamente significativo						
R²= 95%		C.V= 1,83%		Promedio= 86,7%		

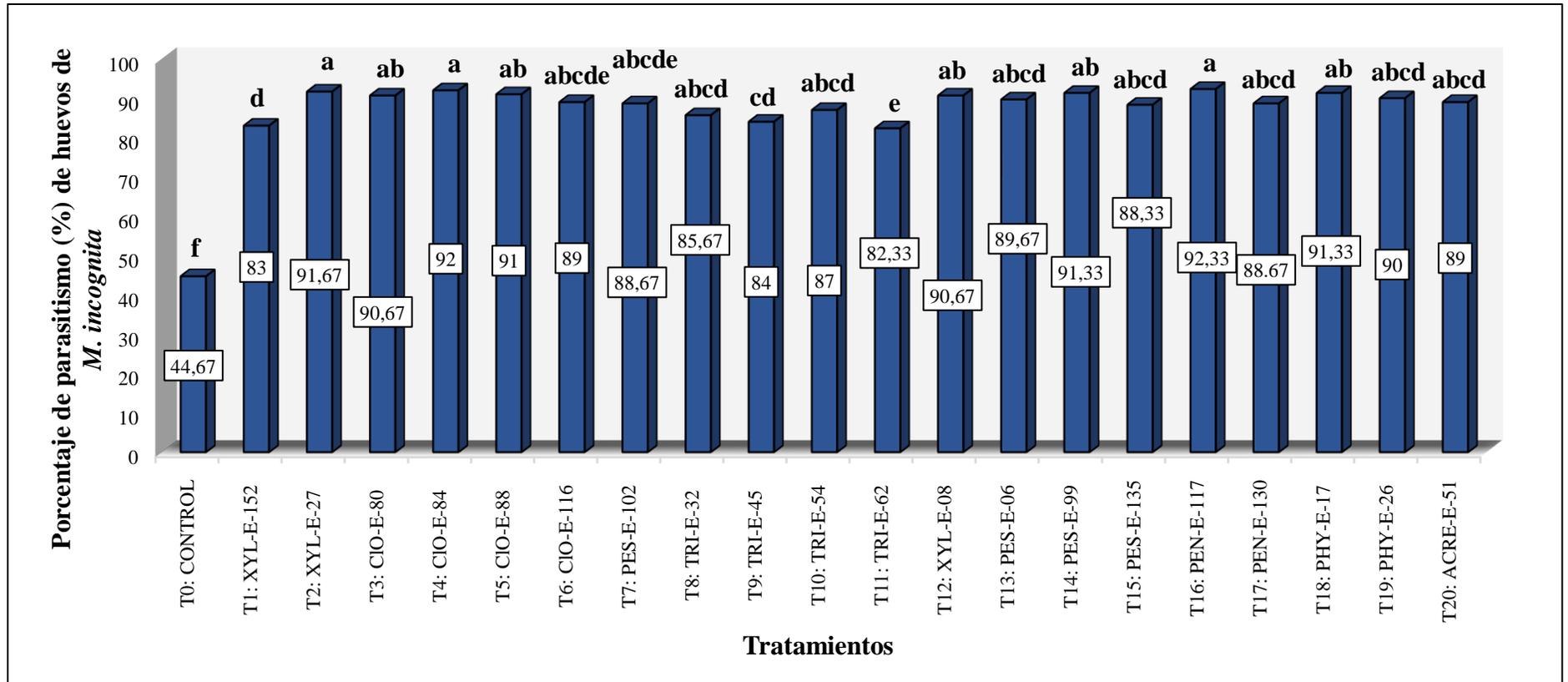


Figura 19: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) del promedio de porcentaje de parasitismo (%) de micoendofíticos de sachá inchi a huevos y estadios juveniles de *Meloidogyne incognita* en placas de Petri con suelo estéril. Durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.ex). Comparados con el control sin inocular con hongos endofíticos, y si con huevos de *M. incognita*.

El análisis de varianza (Tabla 7) indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos (hongos endófitos) y el control, con nivel de significancia de 0,01; datos obtenidos en porcentaje de parasitismo de micoendofíticos de sachá inchi a huevos y estadios juveniles de *Meloidogyne incognita*, transformados a “ASeno (x/100)”.

Así mismo, la Figura 19, muestra el efecto parasítico de micoendofíticos de sachá inchi a huevos y estadios juveniles de *Meloidogyne incognita* en placas de Petri de 90 x 15 mm conteniendo suelo estéril; siendo los tratamientos T2 (T2: XYL-E-27); T4 (T4: CLO-E-84) y T16 (T16: PEN-E-117), con 91,67%; 92% y 92,33% de promedio de porcentaje de parasitismo hacia huevos y estadios juveniles de *Meloidogyne incognita* durante las 4 evaluaciones respectivamente los que tuvieron mejor resultado, pero sin distinguirse con los siguientes tratamientos: T3 (T3: CLO-E-80); T5 (T5: CLO-E-88); T6 (T6: CLO-E-116); T7 (T7: PES-E-102); T8 (T8: TRI-E-32); T10 (T10: TRI-E-54); T12 (XYL-E-08); T13 (T13: PES-E-06); T14 (T14: PES-E-99); T15 (T15: PES-E-135); T17 (T17: PEN-E-130); T18 (T18: PHY-E-17); T19 (T19: PHY-E-26) y T20 (T20: ACRE-E-51), ya que no se mostraron diferencias estadísticas significativas.

Con diferencias estadísticas significativas con los demás tratamientos se tiene a: T1 (T1: XYL-E-152) y T11 (T11: TRI-E-62), con porcentajes de parasitismo de 83% y 82,33% durante las cuatro evaluaciones respectivamente. Y el tratamiento T0 (T0: CONTROL), con gran diferencia estadística significativa respecto a los demás tratamientos con 44,67% de promedio de porcentaje de parasitismo durante las cuatro evaluaciones respectivamente, lo que indica que si hubo diferencia estadística entre los veinte tratamientos y el control, además que los huevos de *Meloidogyne incognita* probablemente desarrollaron y completaron su ciclo biológico normalmente, pero que a la vez representan al número de huevos que por algún factor biótico (huevos inmaduros) o abiótico (temperatura, humedad, etc.), no lograron eclosionar y se quedaron en el suelo.

Según los resultados obtenidos, todas las cepas de hongos endofíticos de sachá inchi, mostradas en la Tabla 2, lograron parasitar huevos de *Meloidogyne incognita* en el suelo. Entre los mejores tratamientos que tuvieron un índice de porcentaje de parasitismo durante las 4 evaluaciones (Figura 19) se encuentran el T2 (T2: XYL-E-27); T4 (T4: CLO-E-80) y T16 (T16: PEN-E-117) con promedios de 91,67%; 92% y 92,33% de promedio de parasitismo durante las 4 evaluaciones respectivamente.

Pero de manera general (Figura 19) todas las cepas mostraron un porcentaje de parasitismo a huevos de *Meloidogyne incognita*, superiores al T0 (T0: CONTROL), quien mostró diferencias estadísticas significativas a los veinte tratamientos durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.ex respectivamente).

Estos resultados tienen similitud con trabajos realizados por, Del Castillo *et al.*, (2014) y Mendoza *et al.*, (2013), concluyendo que cepas nativas de *Trichoderma* sp, disminuyen significativamente tanto la población de huevos como J2 de *Meloidogyne* sp, observando que *Trichoderma* spp, destruyen huevos de *Meloidogyne* sp, en una secuencia de parasitismo que concluye con la completa destrucción a las 72 horas.

Morales (2014) en Costa Rica reporta a *Trichoderma atroviride* como controlador biológico del nemátodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) en el cultivo de banano, mostrando una actividad antagonista similar al testigo químico, con un porcentaje de biocontrol de 72%.

Por otro lado, Martínez *et al.*, (2013) coincide con la efectividad de *Trichoderma* sp, al obtener en sus experimentos el control de fitonemátodos, haciendo referencia a que este hongo exhibe la capacidad de envolver al nemátodo en micelio, y produce metabolitos que actúan como nematicidas, tales como Trichodermin, Suzukacilina, Alameticina, Dermadina, entre otros.

Por su parte Morgan *et al.*, (1986), indica que *Clonostachys* sp, es eficiente en el control biológico de *Meloidogyne* sp, *Heterodera* spp, *Globodera* spp, el hongo puede pasar por una esponja de huevos y puede producir dos tipos de enzimas, proteasas y quitinasas, que son fundamental para el antagonismo.

En la región una investigación similar lo realizó, Cayotopa (2014) evaluó el efecto antagonico de 10 cepas de *Trichoderma* spp, endófito de cacao como biocontrol contra *Meloidogyne incognita*, teniendo resultados altos en cuanto al porcentaje de parasitismo a huevos de *Meloidogyne incognita* en 53,05% y el 51,09% respectivamente.

3.2. Capacidad de inhibición de extractos fúngicos hacia la eclosión de huevos y estadios juveniles de *Meloidogyne incognita*

3.2.1. Dosis baja, al 50% de concentración.

La Tabla 8 y la Figura 20 muestran el Análisis de Varianza con nivel de significancia al 0,01%, y la prueba de Duncan ($p < 0,01$) respectivamente para la

inhibición de extractos fúngicos (50%) de hongos endofíticos aislados de sachá inchi, hacia la eclosión de huevos y estadios juveniles de *M. incognita*, datos transformados a grados.

Tabla 8

Análisis de Varianza del promedio de porcentaje de eclosión de huevos de Meloidogyne incognita, sometidos a extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi, durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.in), datos transformados a grados.

Fuente de variación	G.L	SC	CM	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	20	2 572,19	128,61	15,72	<0,0001	**
Error	40	327,21	0,0081			
Total	60	2 903,25				
**= Altamente significativo						
R²= 89%		C.V= 9,19%		Promedio= 27,1%		

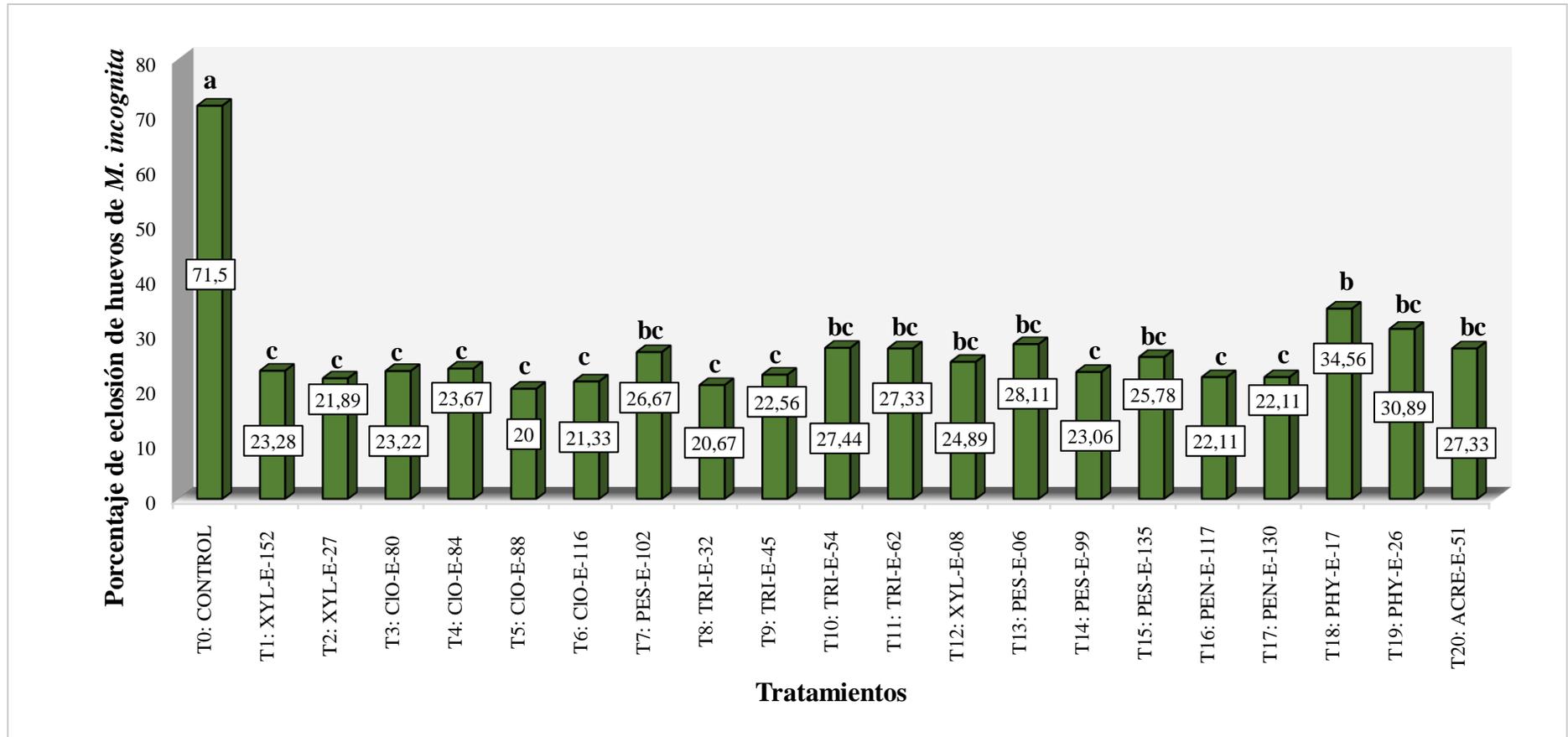


Figura 20: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) del promedio de porcentaje de eclosión (%) de huevos de *Meloidogyne incognita*, sometidos a extractos fúngicos de micoendofíticos de sachu inchi en tubos de ensayo, de la dosis baja, al 50% de concentración. Durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.in).

El análisis de varianza (Tabla 8) indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos (hongos endófitos) y el control con nivel de significancia de 0,01; datos obtenidos en porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* sometidos a extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi, transformados a “Grados”.

Así mismo, la Figura 20, muestra el efecto inhibitorio de micoendofíticos de sachá inchi hacia la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*, incubadas en tubos de ensayo; siendo los mejores tratamientos, T1 (T1: XYL-E-152); T2 (T2: XYL-E-27); T3 (T3: CLO-E-80); T4 (T4: CLO-E-84); T5 (T5: CLO-E-88); T6 (T6: CLO-E-116); T8 (T8: TRI-E-32); T9 (T9: TRI-E-45); T14 (T14: PES-E-99); T16 (T16: PEN-E-117) y T17 (T17: PEN-E-130); con 23,28%; 21,89%; 23,22%; 23,67%; 20%; 21,33%; 20,67%; 22,56%; 23,06%; 22,11% y 22,11% de promedio de porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* durante las 4 evaluaciones respectivamente, pero sin distinguirse estadísticamente de los siguientes tratamientos: T7 (T7: PES-E-102); T10 (T10: TRI-E-54); T11 (T11: TRI-E-62); T12 (T12: XYL-E-08); T13 (T13: PES-E-06); T15 (T15: PES-E-135); T19 (T19: PHY-E-26) y T20 (T20: ACRE-E-51), ya que no mostraron diferencia estadística significativa entre sí.

Con diferencias estadísticamente significativas tenemos al T18 (T18: PHY-E-17), con promedio de porcentaje de eclosión de 34,56% durante las cuatro evaluaciones respectivamente. Y al T0 (T0: CONTROL) con 71,5% de promedio de eclosión durante las cuatro evaluaciones, lo que indica que, si hubo diferencia estadística significativa entre los veinte tratamientos y el control, además que los huevos de *Meloidogyne incognita* se desarrollaron y completaron su ciclo biológico normalmente. Y que los huevos de *M. incognita*, expuestos a extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi, sufrieron la desintegración del protoplasma, matando al embrión, dejando infértil al huevo.

3.2.2. Dosis media, al 70% de concentración.

La Tabla 9 y la Figura 21 muestran el Análisis de Varianza con nivel de significancia al 0,01%, y la prueba de Duncan ($p < 0,01$) respectivamente para la inhibición de extractos fúngicos (70%) de hongos endofíticos aislados de sachá inchi, hacia la eclosión de huevos y estadios juveniles de *M. incognita*, datos transformados a grados.

Tabla 9

Análisis de Varianza del promedio de porcentaje de eclosión de huevos de Meloidogyne incognita, sometidos a extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi, durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.in), datos transformados a grados.

Fuente de variación	G.L	SC	CM	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	20	4 517,1	225,86	31,3	<0,0001	**
Error	40	288,61	0,0072			
Total	60	4 898,68				
**= Altamente significativo						
R²= 94%		C.V= 8,75%		Promedio= 26,9%		

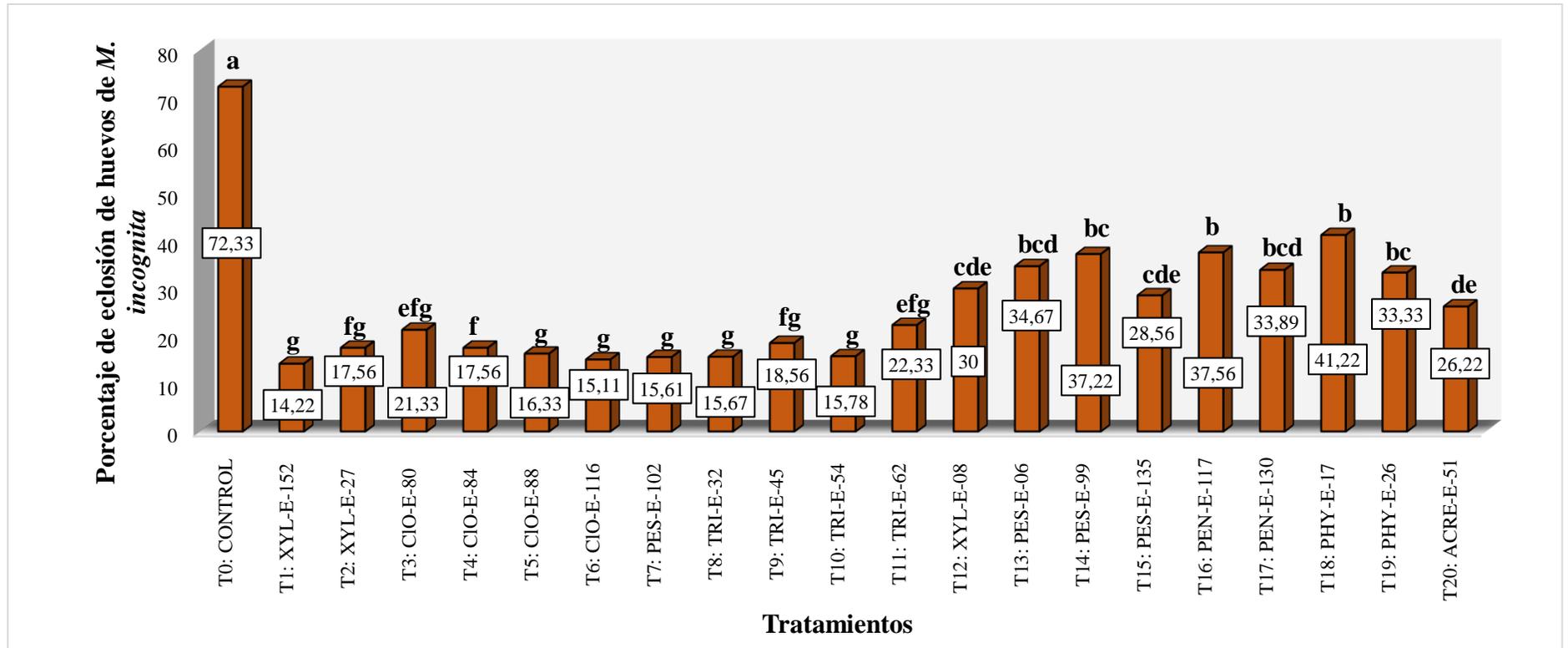


Figura 21: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) del promedio de porcentaje de eclosión (%) de huevos de *Meloidogyne incognita*, sometidos a extractos fúngicos de micoendófitos de sachu inchi en tubos de ensayo, en la dosis media, al 70% de concentración. Durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.in).

El análisis de varianza (Tabla 9) indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos (hongos endófitos) y el control, con nivel de significancia de 0,01; datos obtenidos en porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* sometidos a extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi, transformados a “Grados”.

Así mismo, la Figura 21, muestra el efecto inhibitorio de micoendofíticos de sachá inchi hacia la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*, incubadas en tubos de ensayo; siendo los mejores tratamientos: T1 (T1: XYL-E-152); T5 (T5: CLO-E-88); T6 (T6: CLO-E-116); T7 (T7: PES-E-102); T8 (T8: TRI-E-32) y T10 (T10: TRI-E-54); con 14,22%; 17,56%; 16,33%; 15,11%; 15,61%; 15,67% y 15,78%; de promedio de porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* durante las 4 evaluaciones respectivamente, pero sin distinguirse estadísticamente de: T2 (T2: XYL-E-27); T3 (T3: CLO-E-80); T4 (T4: CLO-E-84); T9 (T9: TRI-E-45) y T11 (T11: TRI-E-62), ya que no mostraron diferencias estadísticas significativas entre sí.

Quienes mostraron diferencias estadísticas significativas fueron: T12 (T12: XYL-E-08); T13 (T13: PES-E-06); T14 (T14: PES-E-99); T15 (T15: PES-E-135); T16 (T16: PEN-E-117); T17 (T17: PEN-E-130); T18 (T18: PHY-E-17); T19 (PHY-E-26) y T20 (T20: ACRE-E-51), con 30%; 34,67%; 37,22%; 28,56%; 37,56%; 33,89%; 41,22%; 33,33% y 26,22% de promedio de porcentaje de eclosión de huevos de *M. incognita*, durante las cuatro evaluaciones. Pero siendo el T0 (T0: CONTROL), con 72,33% de promedio de eclosión durante las cuatro evaluaciones, el tratamiento que mostró más diferencias estadísticas significativas con los veinte tratamientos, lo que indica que los huevos de *Meloidogyne incognita* desarrollaron y completaron su ciclo biológico normalmente. Y que los huevos de *M. incognita*, expuestos a extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi, sufrieron la desintegración del protoplasma, matando al embrión, dejando infértil al huevo, parecido a la dosis baja.

3.2.3. Dosis alta, al 90% de concentración

La Tabla 10 y la Figura 22 muestran el Análisis de Varianza con nivel de significancia al 0,01%, y la prueba de Duncan ($p < 0,01$) respectivamente para la inhibición de extractos fúngicos (90%) de hongos endofíticos aislados de sachá inchi, hacia la eclosión de huevos y estadios juveniles de *M. incognita*, datos transformados a grados.

Tabla 10: *Análisis de Varianza del promedio de porcentaje de eclosión de huevos de Meloidogyne incognita, sometidos a extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi, durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.in), datos transformados a grados.*

Fuente de variación	G.L	SC	CM	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	20	4 703	235,15	44,1	<0,0001	**
Error	40	213	0,0053			
Total	60	5 015				
**= Altamente significativo						
R²= 96%		C.V= 11,5%		Promedio= 13%		

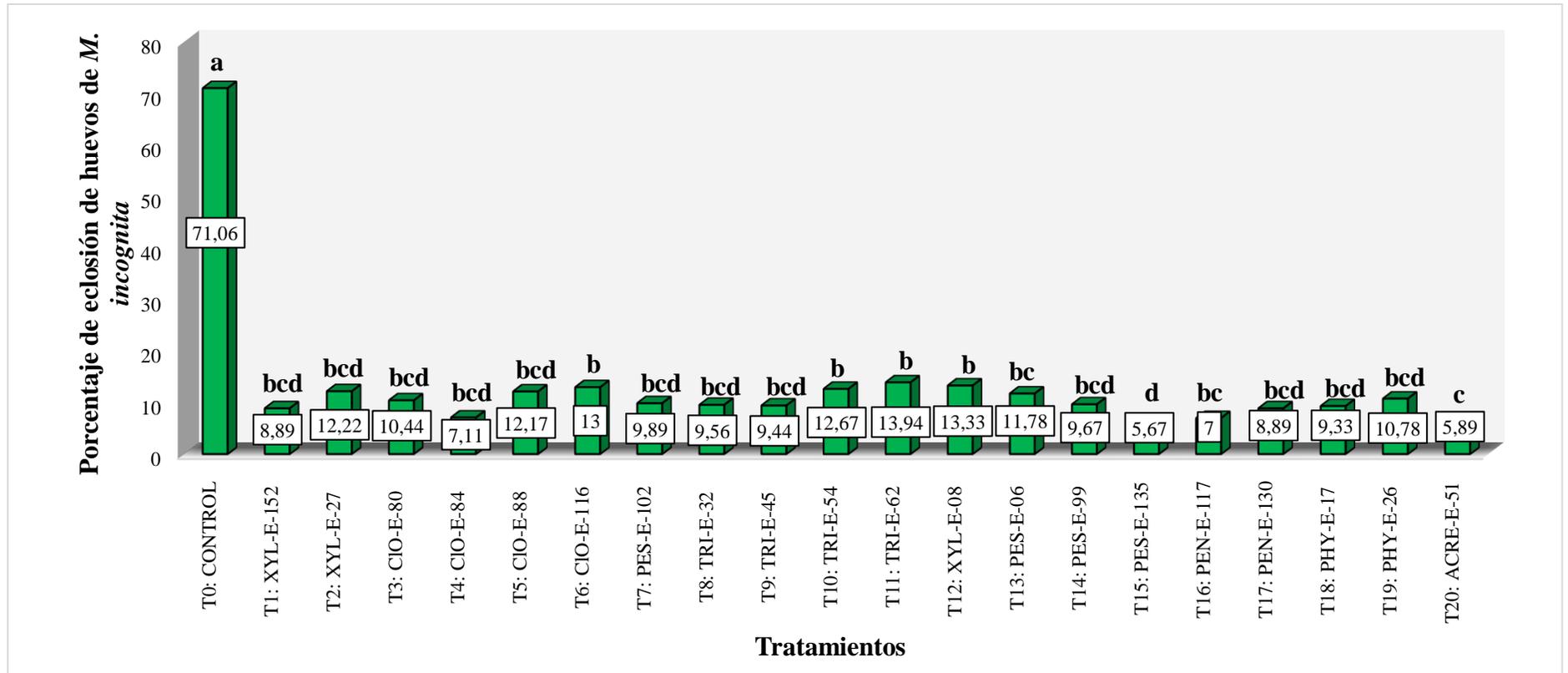


Figura 22: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) del promedio de porcentaje de eclosión (%) de huevos de *Meloidogyne incognita*, sometidos a extractos fúngicos de micoendofíticos de sachu inchi en tubos de ensayo, en la dosis alta, al 90% de concentración. Durante las cuatro evaluaciones (4; 8; 12 y 16 d.d.in).

El análisis de varianza (Tabla 10) indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos (hongos endófitos) y el control, con nivel de significancia de 0,01; datos obtenidos en porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* sometidos a extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi, transformados a “Grados”.

Así mismo, la Figura 22, muestra el efecto inhibitorio de micoendofíticos de sachá inchi hacia la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*, incubadas en tubos de ensayo; siendo el mejor tratamiento, el T15 (T15: PES-E-135) con 5,67%; de promedio de porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* durante las 4 evaluaciones respectivamente, pero sin distinguirse estadísticamente de: T1 (T1: XYL-E-152); T2 (T2: XYL-E-27); T3 (T3: CLO-E-80); T4 (T4: CLO-E-84); T5 (T5: CLO-E-88); T7 (T7: PES-E-102); T8 (T8: TRI-E-32); T9 (T9: TRI-E-45); T13 (T13: PES-E-06); T14 (T14: PES-E-99); T16 (T16: PEN-E-117); T17 (T17: PEN-E-130); T18 (T18: PHY-E-17); T19 (T19: PHY-E-26) y T20 (T20: ACRE-E-51), con 8,89%; 12,22%; 10,44%; 7,11%; 12,17%; 9,89%; 9,56%; 9,44%; 11,78%; 9,67%; 7%; 8,89%; 9,33%; 10,78%; y 5,89% de promedio de porcentaje de eclosión de huevos de *M. incognita* durante las cuatro evaluaciones, ya que no mostraron diferencias estadísticas significativas entre sí.

Mientras que los tratamientos que mostraron diferencia estadística significativa fueron el T6 (T6: CLO-E-116); T10 (T10: TRI-E-54); T11 (T11: TRI-E-62) y T12 (T12: XYL-E-08) con 13%; 12,67%; 13,94% y 13,33% de promedio de porcentaje de eclosión de huevos de *M. incognita*. En cambio, el T0 (T0: CONTROL) con 71,06% de promedio de porcentaje de eclosión durante las cuatro evaluaciones, mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los veinte tratamientos, lo que indica que los huevos de *Meloidogyne incognita* desarrollaron y completaron su ciclo biológico normalmente. Y que los huevos expuestos a extractos fúngicos de hongos endofíticos de sachá inchi, sufrieron la desintegración del protoplasma, matando al embrión, dejando infértil al huevo, igual que en las demás dosis.

Los mejores resultados del efecto inhibitorio de micoendofíticos de sachá inchi hacia la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* con extractos fúngicos se obtuvieron en la dosis alta (al 90% de concentración) (Figura 22). Entre los mejores tratamientos que estadísticamente tuvieron más bajo índice de porcentaje de eclosión de

huevos durante las 4 evaluaciones se encuentra, el T15 (T15: PES-E-135); con un promedio de 5,67% de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*.

Comparando las tres concentraciones (al 50%; 70% y 90%) se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en los 20 tratamientos con respecto del control, en cuanto al porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*, comparados con el T0 (T0: CONTROL). Obteniendo en el control 71,5% de eclosión (Figura 20); 72,33% de eclosión (Figura 21) y 71,06% de eclosión (Figura 22).

Un trabajo de investigación similar realizado por Bokhary (2002), en la que estudió el efecto *in vitro* de filtrados puros de *Trichoderma* spp., sobre hembras y masas de huevos de *Rotylenchulus reniformis* y *Meloidogyne javanica*, demostró que *Trichoderma* spp., reducen el movimiento de *Rotylenchulus reniformis* después de dos días de tratamiento, mientras que después de una semana el efecto fue incrementado. Los porcentajes de hembras no activas de *Rotylenchulus reniformis* fueron 89%; 100%; 93% y 100%.

Por su parte Kada *et al.*, (2015), extrajeron dos filtrados de *Penicillium* spp., contra el nemátodo del quiste *Heterodera avenae*, exponiendo huevos a diferentes concentraciones por un período de 24 a 48 horas, con resultados de mortalidad de huevos en 82,45% respectivamente después de 48 horas de exposición.

Meyer *et al.*, (2004) reportan a *Acremonium* sp, y *Penicillium* sp, entre otros hongos estudiados como precursores de compuestos naturales, que afectan la envoltura de huevos y movilidad de J2 de *Heterodera glycines* y *Meloidogyne incognita* en el cultivo de la soja, demostrando que los aislamientos evaluados son capaces de producir compuestos activos contra estos nemátodos.

Otro trabajo similar lo realizó Cayotopa (2014) en donde trabajó con tres concentraciones de metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp, endófito de cacao (96,15%; 50% y 25%) obteniendo mejores resultados con la concentración más alta, donde la mayoría de tratamientos a los dieciséis días después de la inmersión (d.d.in.) se encontraron por debajo del 18% de eclosión.

CONCLUSIONES

De los experimentos realizados de parasitismo por hongos endófitos y los extractos de estos hongos sobre huevos y juveniles (J2) de *Meloidogyne incognita*, se determinó que tiene acción biológica de tipo nematocida porque redujo la eclosión de huevos y el desarrollo del mencionado nemátodo.

En cuanto a parasitismo de huevos de *Meloidogyne incognita*, con micoendofíticos de sachá inchi, se concluye que durante las cuatro evaluaciones los tratamientos que mostraron mejor índice de porcentaje de parasitismo fueron, el T2 (T2: XYL-E-27); T4 (T4: CLO-E-80) y T16 (T16: PEN-E-117) con promedios de 91,67; 92% y 92,33% de parasitismo.

En la prueba del efecto *in vitro* de extractos fúngicos sobre la eclosión de huevos de *M. incognita*, se concluye que la mejor concentración fue al 90%, ya que todos los tratamientos inhibieron la eclosión de huevos en un porcentaje muy bajo comparado con las demás dosis, siendo el mejor tratamiento durante las 4 evaluaciones el T15 (T15: PES-E-135) con un promedio de 5,67% de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*; esto nos indica que tiene metabolitos secundarios que tienen acción biológica de tipo nematocida.

RECOMENDACIONES

En cuanto a parasitismo de huevos de *Meloidogyne incognita*, con micoendofíticos de sachá inchi, se recomienda realizar aparte del método de la bandeja otro método de aislamiento de nemátodos, ya que hay gran probabilidad que se podrían quedar en el suelo cierta cantidad de población y de esta manera obtener datos más precisos. Dar condiciones de fertilización (materia orgánica), para que los hongos endófitos se desarrollen mejor y al mismo tiempo mantener el suelo húmedo para favorecer el desarrollo de los nemátodos. Considerar huevos fértiles (con dos a tres células diferenciadas) y estadios juveniles (J1) de *M. incognita* para poder asegurar una población alta de nemátodos.

En cuanto al efecto *in vitro* de extractos fúngicos sobre la eclosión de huevos de *M. incognita*, se recomienda realizar estudios espectroscópicos con la finalidad de analizar los compuestos químicos (metabolitos secundarios) que podrían estar inhibiendo la eclosión de huevos, o destruyendo las estructuras de huevos y juveniles; para formular en el futuro nematicidas comerciales que podrían estar al alcance del productor de *Plukenetia* spp.

Realizar estudio de hongos endófitos, en otros cultivos promisorios y determinar su actividad biológica de los diferentes extractos fúngicos (metabolitos secundarios), para la búsqueda de nuevos plaguicidas como: fungicidas, nematicidas, acaricidas, insecticidas.

Efectuar estudios de biocontrol de nemátodos, promotor de crecimiento, resistencia de plantas a factores bióticos y abióticos u otros ensayos, con los géneros de hongos endófitos presentados, en plantas de sachá inchi a nivel de vivero y posteriormente a campo, ya que este cultivo se encamina hacer un cultivo alternativo más en la Región San Martín.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abello, J. F., & Kelemu, S. (2006). Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, vol 7(2), Pág. 55-57. Cali, Colombia.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Balderas - México 1995: Editor UTEHA; 5° Edición.
- Ai-Rong, L., Tong, X., & Liang Dong, G. (2007). Molecular and morphological description of *Pestalotiopsis hainanensis* sp. nov., a new endophyte from a tropical region of China. *Fungal Diversity*. Vol 24, Pág. 23-36.
- Alvarez, L. F., & Rios, S. J. (2007). Estudio de viabilidad económica del cultivo de *Plukenetia volubilis* Linneo “SACHA INCHI” – Departamento de San Martín. IIAP - POA. Iquitos.
- Arévalo, G. (2000). El cultivo del sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la amazonía. INIA-Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología - PRONARGE, Estación Experimental El Porvenir. Tarapoto.
- Bokhary, F. (2002). Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. *Biological Science Dept., Faculty of Science, King Abdulaziz University, Saudi Arabia*. Arabia Saudita.
- Cepeda, M. (1996). *Nematología agrícola*. 305 páginas. México: Editorial Trillas S.A de C.V.
- De Souza, A. P. (2010). Potential biotecnológico de fungos do genero *Penicillium* e interacao com cana-de-acúcar. Universidade de Sao Paulo. Piracicaba.
- Del Castillo, O., Collantes, C., Cox, G., & Wilson, J. (2014). Efecto de dos especies nativas de *Trichoderma* sobre huevos y juveniles de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio. *REBIOLEST*; 2(1): e24, Pág. 1-9.
- Díez, M. A., López, J. A., Urbano, P., & Bello, A. (2010). Biodesinfección de suelos y manejo agronómico. Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino. España.
- Dostert, N., Roque, J., Brokamp, G., Cano, A., La Torre, M. I., & Weigend, M. (2009). Desarrollo de monografías botánicas (factsheets) para cinco cultivos peruanos Hojas Botánicas: Sacha inchi – *Plukenetia volubilis* L. Lima-Perú: Primera Edición.

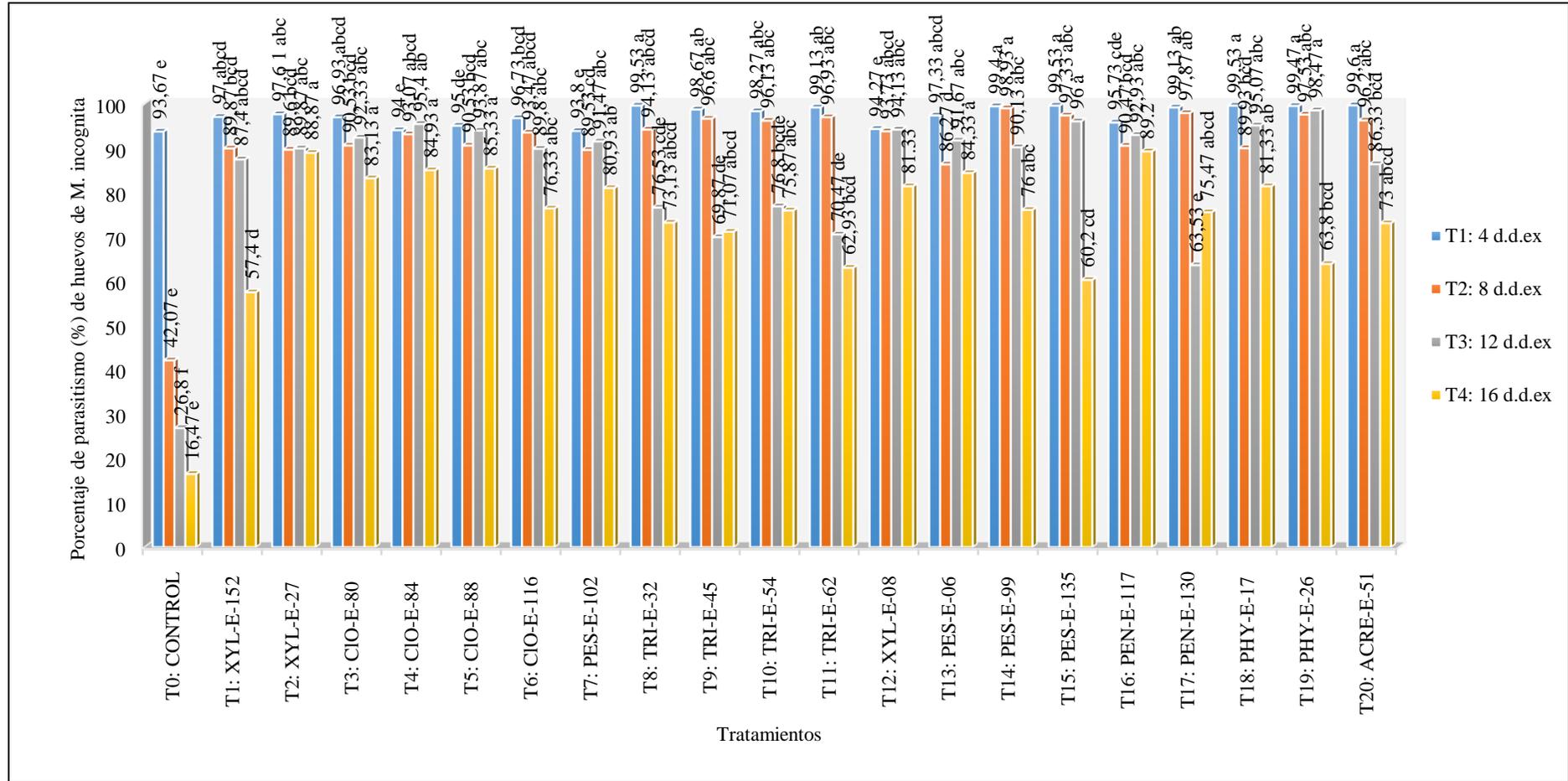
- Gillespie, L. J. (2007). A revision of paleotropical Plukenetia (Euphorbiaceae) including Two New Species from Madagascar. *Systematic Botany*, 32(4), Pág. 780-802.
- Guzmán, Ó. A., Castaño, J., & Villegas, B. (2012). Principales nematodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. *agron.* 20(1), Pág. 38-50.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* Vol. 24 No. 1, Pág. 14-21.
- Kada, R., Aissa, M., & Fatiha, A. (2015). Biocide effect of Fusarium solani and Penicillium spp against the cereals cyst nematode "Heterodera avenae". *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol 7(3), Pág. 2434-2439.
- Koneman, E. W., Roberts, G. D. (1997). *Practical laboratory mycology*. Tercera edición. Baltimore. Williams & Wilkins.
- Kusari, S., Hertweck, C., & Michael, S. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, vol 19, pág. 792-798.
- López, J. L. (2012). Eficiencia de productos orgánicos en la reducción de la población de Meloidogyne sp. en rosas (Rosae sp). Ecuador.
- Manco, E. I. (2006). Cultivo de sacha inchi. INIEA – E.E.A. "El Porvenir" Tarapoto. Tarapoto - San Martín.
- Marquez, K., Gonzales, R., Arévalo, L., & Solis, R. (2013). Respuesta de accesiones de sacha inchi Plukenetia volubilis L. A la infestación inducida del nematodo Meloidogyne incognita (Kofoit and White, 1919) Chitwood, 1949. *FOLIA Amazónica VOL. 22 N° 1-2*, Pág. 97-103.
- Martijn ten Hoopen, G. (2010). Compatibility between Clonostachys isolates with a view to mixed inocula for biocontrol. pp. 1204–1215. by The Mycological Society of America, Lawrence.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg.* Vol. 28 No. 1, Pág. 1-11.
- Martínez, E. (2003). Estudio de especies micotoxígenas del género Penicillium: Penicillium verrucosum. Barcelona - España.

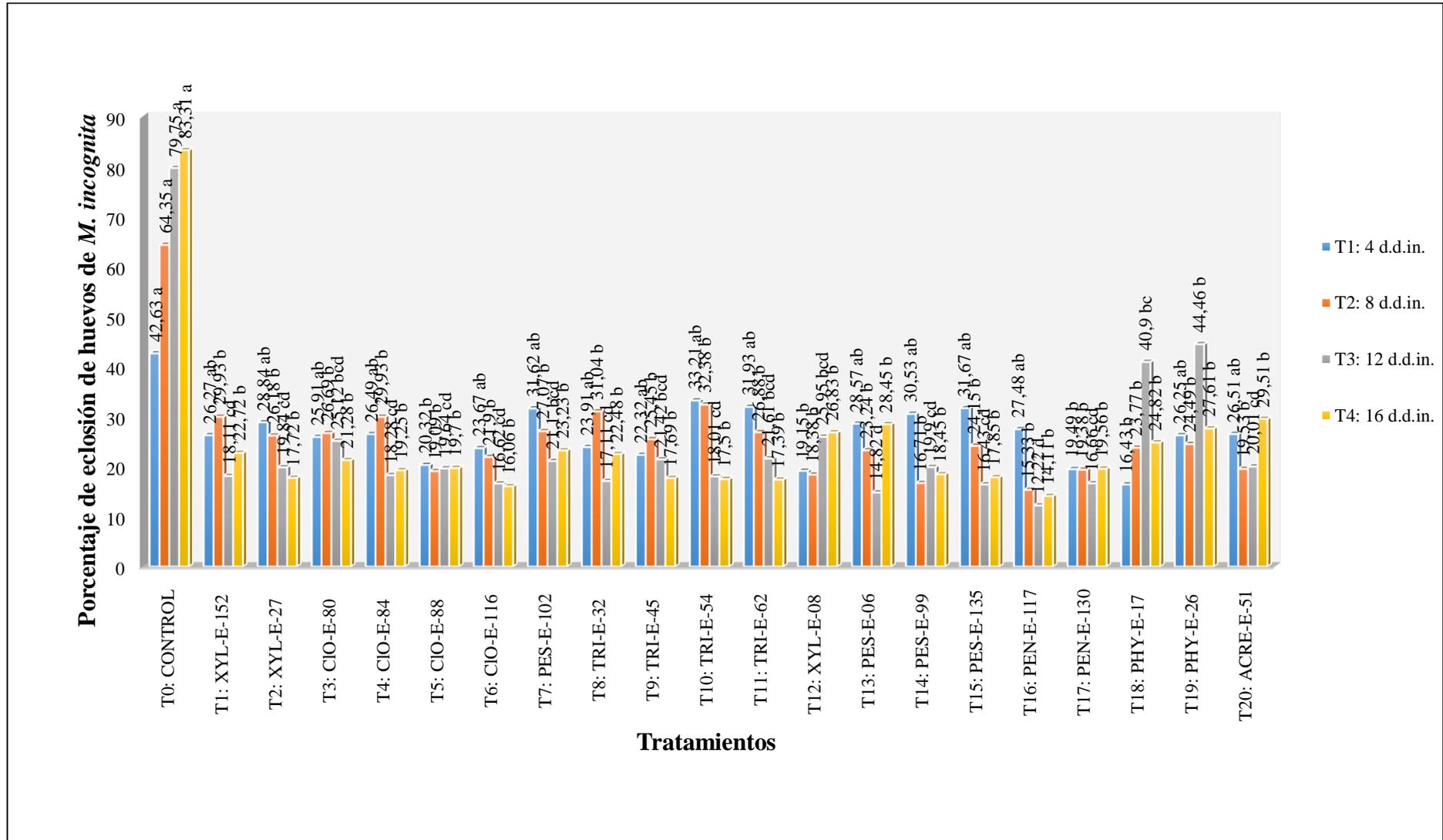
- Mendoza, G. A., Wilson, J. H., & Colina, J. C. (2013). Efecto de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio. *REBIOLEST* 1(2), Pág. 65-71.
- Meyer, S. L., Huettel, R. N., Liu, X., Humber, R. A., Juba, J., & Nitao, J. K. (2004). Activity of fungal culture filtrates against soybean cyst nematode and root-knot nematode egg hatch and juvenile motility. *Nematology*, Vol. 6(1), Pág. 23-32.
- Mogollón, I., Moreno, S., Iturriaga, T., & Taddei, A. (2013). Análisis químico preliminar y actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de cuatro especies del género *Xylaria*. *Avances en Ciencias e Ingeniería*: 4(1), Pág. 75-83.
- Morales, D. (2014). Bioprospección de hongos endófitos para el control biológico del nemátodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn en el cultivo del banano. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
- Moreira, R., França de M, P., Vitorino, Á., & Maffia, L. A. (2014). Uso e perspectiva de *Clonostachys rosea* como agente de biocontrol. *REVISTA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS* Volumen 31 (1) :, Pág. 78 - 91.
- Morgan, G., & Rodríguez, R. (1986). Fungi associated with cysts of potato cyst nematodes in Perú. *Nematropica*. Vol. 16, N° 01, Pág. 21-31.
- Mousa, W. K., & Raizada, M. N. (2013). The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 4; Article 65, Pág. 1-18.
- Ramesh, V., Thalavaipandian, A., Karunakaran, C., & Rajendran, A. (2012). Identification and comparison of *Xylaria curta* and *Xylaria* sp. from Western Ghats-Courtallum Hills, India. *Mycosphere* Doi 10.5943/mycosphere, Pág. 607-615.
- Rey, M., Delgado Jarana, J., Rincón, A., Limón, C., & Benítez, T. (2000). Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Rev Iberoam Micol*; vol 17:, Pág. 31-36.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*. Vol, 182, Pág. 314-330.

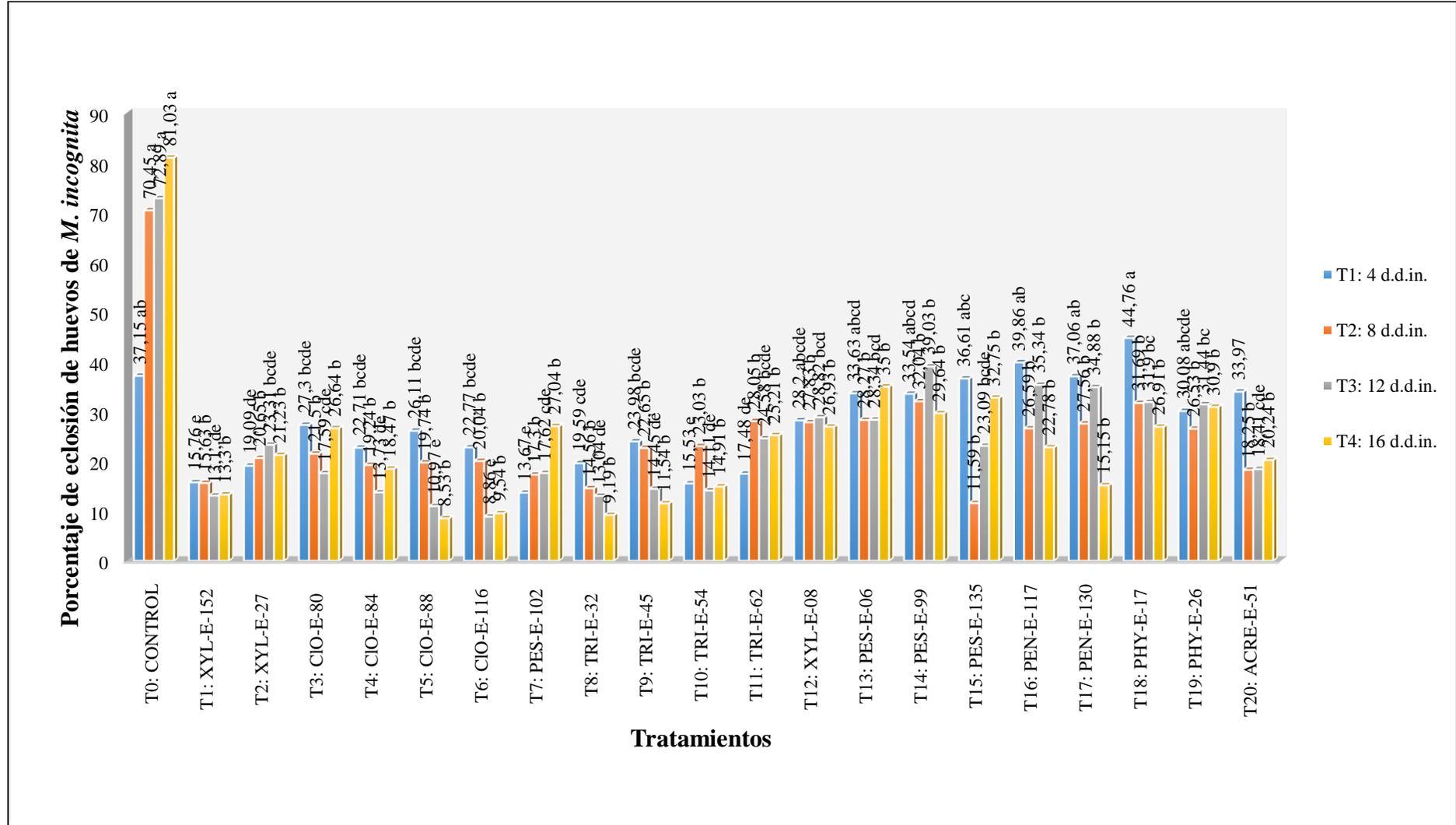
- Russell, J., Huang, J., Anand, P., Kucera, K., Sandoval, A., Dantzler, K., Strobel, S. (2011). Biodegradation of Polyester Polyurethane by Endophytic Fungi. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. Vol. 77, No. 17, Pág. 6076–6084.
- Sánchez, R. E., Sánchez, B. L., Sandoval, Y. M., Ulloa, Á., Armendáriz, B., García, M. C., & Macías, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol 16(2):, pág. 132-146.
- Schneider, G., Anke, H., & Sterner, O. (1996). Xylaramide, a New Antifungal Compound, and Other Secondary Metabolites from *Xylaria longipes*. *Universität Kaiserslautern. Z. Naturforsch.* 51c, Pág. 802-806.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* Vol 67, Pág. 257-268.
- Talavera, M. (2003). "Manual de Nematología Agrícola – Introducción al Análisis y al Control Nematológico para Agricultores y Técnicas de Agrupaciones de Defensa Vegetal". Institut de recerca i formació agrària i pesquera. Brasil 2003.
- Taylor, A. L., & Sasser, J. N. (1983). "Biología, Identificación y Control de los Nemátodos del Nódulo de la Raíz (Especies de *Meloidogyne*).". Carolina del Norte – Estados Unidos.: Artes Graficas de la Universidad del Estado de Carolina del Norte.
- Torres, L. C. (2003). "Principales Nematodos Fitoparásitarios". Lima - Perú 2003.: Editor SENASA. 1º Edición.
- Vero, S., & Mondino, P. (1999). Control biológico postposecha. Medidas para conservar frutas y hortalizas. *Horticultura Internacional*, Pág. 29-36.
- Wicklow, D., & Poling, S. (2009). Antimicrobial Activity of Pyrrocidines from *Acremonium zeae* against Endophytes and Pathogens of Maize. *PHYTOPATHOLOGY. Biological Control*. Vol. 99, No. 1, Pág. 109-115.

ANEXOS

Anexo 1: Porcentaje de parasitismo de huevos de *Meloidogyne incognita*, durante las cuatro evaluaciones.



Anexo 2: Porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*, durante las cuatro evaluaciones en la dosis baja (50% de concentración)

Anexo 3: Porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*, durante las cuatro evaluaciones en la dosis media (70% de concentración)

Anexo 4: Porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita*, durante las cuatro evaluaciones en la dosis media (90% de concentración)