

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Efectos de la concentración de carbono y la relación
carbono/nitrógeno sobre la producción de
conidias de *Paecilomyces lilacinus***

Proyecto de Investigación

Juan Carlos Samaniego Branstetter

Ingeniería en Agroempresas

Trabajo de Titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Agroempresas

Quito, 8 de diciembre del 2015

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

COLEGIO CIENCIAS E INGENIERÍA

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Efectos de la concentración de carbono y la relación
carbono/nitrógeno sobre la producción de
conidias de *Paecilomyces lilacinus***

Juan Carlos Samaniego Branstetter

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Carlos Ruales , M.S

Firma del profesor

Quito, 8 de diciembre del 2015

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Juan Carlos Samaniego Branstetter

Código: 00103689

Cédula de Identidad: 0501982524

Lugar y fecha: Quito, diciembre del 2015

Agradecimientos

Agradezco especialmente a mis padres Juan Carlos Samaniego y Jackie de Samaniego por todo el apoyo incondicional que me han brindado todos estos años. Nada de esto fuera posible sin ustedes. De igual manera me gustaría agradecer a Diana Molina por toda la ayuda que me ha brindado en estos tiempos difíciles y cuando más lo he necesitado. También me gustaría reconocer todo el apoyo y compañerismo que me han enseñado José Andrango y Esteban Espinosa. Finalmente me gustaría agradecer a todos los profesores de la carrera, ya que me han guiado y han enseñado valiosas lecciones.

RESUMEN

Desde el comienzo de la agricultura, los humanos han tenido que lidiar con plagas que atacan a sus cultivos y como consecuencia se produce una reducción en los rendimientos de los mismos. Actualmente, una de las plagas más serias son los nemátodos, ya que se estima que causan la pérdida de hasta un 12% en rendimientos del cultivo a nivel mundial lo cual representa alrededor de 78 billones de dólares anuales. Los nemátodos son una plaga complicada de controlar, ya que muchos de los nematicidas químicos usados actualmente no afectan al estadio inicial de huevo que presentan estos organismos. Sin embargo, nuevas técnicas de control se están empleando, entre las cuales destaca la utilización de controladores biológicos. *Paecilomyces lilacinus* es un hongo *Ascomycota* que ataca a varios estadios del nematodo y puede ser muy eficiente si se lo encuentra en concentraciones adecuadas. La aplicación de estos organismos se vuelve cada vez más común por lo que las eficiencias en los métodos de producción pueden ser alcanzados. La hipótesis del estudio plantea que estos factores juegan un papel importante sobre la producción en la concentración final de conidias de *P. lilacinus*. Por lo que esta investigación evaluó a los 14 días la producción de conidio sobre un sustrato sólido que tenían niveles con respecto a la concentración de carbono y la relación C:N (carbono/nitrógeno). Para comprobar la hipótesis se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3^2 , el cual contiene 9 tratamientos con dos factores y 15 observaciones. Las variables independientes fueron la concentración de carbono y la relación C:N con tres niveles cada factor. Los niveles de concentración de carbono fueron 10 g/L, 20 g/L y 30 g/L, mientras que los niveles de la relación C:N fueron 20:1, 30:1 y 40:1. Para evaluar los tratamientos se realizó un conteo de conidias utilizando una cámara de Neubauer en una dilución seriada de 1×10^{-1} . Los resultados indicaron una mayor concentración final de conidias en el tratamiento A3B3 (30 g/L, 40:1), mientras que la concentración final de conidias más baja se presentó en el tratamiento A1B3 (10g/L, 40:1), aunque no tuvo una diferencia estadística con el tratamiento A1B1 (10 g/L, 20:1). El análisis del ANOVA demostró que ambos factores y la relación entre estos dos tienen un efecto directo sobre la concentración final de conidias de *P. lilacinus*.

Palabras clave: control biológico, nemátodos, control de plagas, *Paecilomyces lilacinus*, concentración de carbono, relación C:N

ABSTRACT

Since the beginning of agriculture, humans have had to deal with pests that attack crops and as a result there is a reduction in crop yields. Currently, one of the most serious pests are nematodes, as it is estimated to cause the loss of up to 12% in crop yields worldwide which represents about 78 billion dollars annually. Nematodes are a difficult pest to control, since many of the presently used chemical nematicides do not affect the initial stage of egg that have these organisms. However, new control techniques are being used, among which the use of biological control agents. *Paecilomyces lilacinus* is Ascomycota a fungus that attacks various stages of nematode and can be very efficient if it is found in adequate concentrations. The application of these organisms is becoming increasingly common so efficiencies in production methods need to be achieved. This study evaluated conidia production after a 14 days incubation period on a solid substrate having variants on carbon concentration and the C: N ratio(carbon / nitrogen). The hypothesis of the study suggests that these factors play an important role on production in the final concentration of conidia of *P. lilacinus*. To test the hypothesis a statistical design scheme was raised. A completely randomized factorial arrangement 3^2 was elaborated, which contained 9 treatments with two factors. The independent variables were the concentration of carbon and the C: N ratio with three variants each factor. The carbon concentration levels were 10 g / l, 20 g / l and 30 g / l, while the levels of the C: N ratio was 20: 1, 30: 1 and 40: 1. To evaluate the treatments a count of conidia was performed using a Neubauer chamber in a serial dilution of 1×10^{-1} . The results indicated a higher final concentration of conidia in the A3B3 (30 g / l, 40: 1) treatment, whereas the final concentration of the conidia lower A1B3 (10g / l, 40: 1) treatment occurred, although not He had a statistical difference with A1B1 (10 g / l, 20: 1) treatment. ANOVA analysis showed that both factors and the relationship between these two have a direct effect on the final concentration of conidia of *P. lilacinus*.

Key words: Deben ser una traducción precisa al inglés de las palabras clave.

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos.....	4
1. Introducción	11
1.1 Antecedentes	11
1.2 Justificación	13
2. Objetivos	15
2.1 Objetivo General	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. Hipótesis.....	15
4. Revisión de Literatura	15
4.1 Métodos de control	15
4.1.1 Manejo de plagas	15
4.2 Nemátodos	16
4.2.1 Importancia y descripción	16
4.2.2 Ciclo biológico de los nemátodos.....	18
4.2.3 Métodos de control y manejo	20
4.3 <i>Paecilomyces lilacinus</i>	21
4.3.1 Caracterización general	21
4.3.2 Ciclo biológico	23
4.3.3 Modo de Acción	23
5. Materiales y Métodos	25
5.1 Diseño estadístico	26
5.2 Inóculo inicial	27
5.3 Caldo base.....	28
5.4 Preparación de sustrato	28
5.5 Inoculación del sustrato	30
5.6 Incubación del sustrato	30
5.7 Extracción y conteo de conidias	31
6. Resultados	32
7. Discusión.....	35
8. Conclusiones	38
9. Recomendaciones.....	39
10. Bibliografía.....	41
11. Anexos.....	50
Anexo 1. Cámara de Neubauer utilizada para el experimento.....	50
Anexo 2. Método de conteo para el uso de la cámara de Neubauer.....	50

Anexo 3. Medio de cultivo A3B3 después de 14 días de incubación	51
Anexo 4. Sedimentación del carbón triturado	51
Anexo 5. Conteo de conidias del tratamiento A3B3 bajo microscopio (60x).....	52
Anexo 6. Conteo de conidias (# de conidia/ 0.004 mL).....	52
Anexo 7. Datos de conteo de conidias por tratamiento (#conidias/ 0.004 mL)	53
Anexo 8. Diagrama de dispersión de datos agrupados por tratamiento	54
Anexo 9. Transformación de datos (concentración de conidias/g de muestra)	55
Anexo 10. Componente del ANOVA	56
Anexo 11. Tabla de comparación de medias por el método de Tukey	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Disposición de los tratamientos	26
Tabla 2. Cantidades de azúcar y urea agregados en los diferentes tratamientos (diluidos en 225 mL de caldo base)	29
Tabla 3. Valores Medios de los tratamientos (# de conidias / 0.004 mL).....	32
Tabla 4. Valores medios de los tratamientos.....	33
Tabla 5. ANOVA de diseño completamente al azar con arreglo factorial 3^2 ($p < 0.05$).....	33
Tabla 6. Prueba de Tukey al 5% para producción de conidias	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de ejemplares macho y hembra de nemátodos	18
Figura 2. Estadíos del ciclo de vida de un nematodo	19
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i>	20
Figura 4. Conidióforos de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	23
Figura 5. Hifas de <i>Paecilomyces lilacinus</i> parasitando huevos de <i>Meloidogyne spp.</i>.....	25

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Las exigencias de la agricultura moderna ocasionan prácticas agrícolas que no son sustentables como la quema de suelos, la falta de rotación de cultivos, y el uso excesivo de agroquímicos. Todas estas prácticas afectan a las características físicas, químicas y biológicas de los suelos. Un aspecto muy importante, pero muy ignorado, es la microfauna presente en el suelo, la cual está compuesta por un gran número de microorganismos, entre los cuales podemos encontrar bacterias, hongos, virus, protozoarios, entre otros (Benintende, 2008). Es importante saber, que un gran número de estos organismos interactúan con las plantas de diferentes formas, y que pueden ser benéficas o dañinas para ellas. Los organismos dañinos afectan de una manera adversa al desarrollo y salud de las plantas, mientras que los benéficos son los que favorecen y estimulan el desarrollo de las plantas (Higa y Parr, 2001)

El primer plaguicida sintetizado comercialmente fue el DDT en los Estados Unidos en el año 1945, y desde entonces, más de 200.000 productos comerciales han sido registrados en la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés). Se estima que el 75% del consumo de pesticidas en el mundo es de países desarrollados, sin embargo, la cantidad de implementación de estos productos van en aumento en países en vías de desarrollo. (Ramírez y Lacasana, 2001). Actualmente, los agricultores se han acostumbrado a la utilización de agroquímicos, sin embargo, la gran mayoría de ellos desconoce de los efectos nocivos que tienen estos productos. Estudios han demostrado, que el uso de varios de estos productos comerciales afectan de manera directa a varios tipos de microorganismos que son nativos en la rizosfera y que además tienen un interés biológico para el bienestar de las plantas (Wesseling y Castillo, 2002). Para

empeorar la situación, el suelo tiene la capacidad de retener varios tipos de moléculas, por lo que la persistencia de un pesticida puede llegar a durar varios años (Rivera, Camelo, Estrada , y Obando , 2012). Por otro lado, el uso indebido de varios biosidas ha creado resistencia a los mismos, limitando así su efectividad. Por este motivo, en los últimos años se ha visto una mayor acogida a nuevas estrategias de manejo de cultivos, los cuales se pueden englobar en el Manejo Integrado de Plagas (MIP). El MIP es una estrategia que se caracteriza por ser preventivo y perdurable, que utiliza tácticas compatibles para controlar y suprimir las poblaciones de organismos dañinos a niveles que no produzcan pérdidas económicamente considerables (Hilje, 1996).

Entre las técnicas incluidas en el MIP se encuentra la utilización de organismos benéficos que controlan plagas. Los organismos benéficos pueden ser catalogados como cualquier ser que ayude a suprimir y controlar a una población de organismos que estén afectando al crecimiento y desarrollo del cultivo (Higa y Parr, 2001). En la actualidad, se emplean diferentes microorganismos entre los cuales, los más comunes son *Bacillus*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Beauveria* y *Trichoderma*. El aspecto positivo de estos controladores es que tienen una especificidad mucho más alta que la gran mayoría de productos químicos y además no dejan residuos tóxicos (Cogollo, 2012).

El hongo *Paecilomyces lilacinus* es un organismo que habita en la rizosfera, especialmente en suelos ricos en materia orgánica que contenga una buena cantidad de humedad. Sus poblaciones son mayores en climas templados y es reconocido por su potencial como controlador biológico. Su mayor relevancia es como patógeno de nemátodos, ya que es muy eficiente reduciendo poblaciones de este tipo de plaga (Cano, 2011). A pesar de que se lo puede encontrar a este organismo de forma natural en el suelo, rara vez se hallan poblaciones lo suficientemente numerosas como para lograr un control

eficiente. Por esta razón, es recomendable hacer aplicaciones de este microorganismo para lograr elevar los niveles de población y así tener un mejor control (Monzón, Herrera, y otros, 2009). Este hongo parasita huevos y los estadíos juveniles de nemátodos con gran facilidad. Además, este hongo tiene la capacidad de sobrevivir como saprófito en el suelo en el caso de ausencia de nemátodos. *P. lilacinus* produce conidios a partir de conidióforos erectos que se desarrollan desde los micelios (Esser y El-Gholl, 1993).

Este organismo tiene la capacidad de reproducirse bajo condiciones apropiadas, por lo que su cultivo es factible. Por esta razón, varias fincas agrícolas están optando por la elaboración de productos a base de *P. lilacinus* de una manera artesanal, es decir, a escalas relativamente pequeñas y con reducidos componentes tecnológicos (Sivila y Alvarez, 2013). Esto trae como consecuencia una menor dependencia hacia casas comerciales y hacia productos químicos que pueden tener efectos perjudiciales. En la actualidad, no existen modelos o guías estandarizadas para la producción artesanal de *Paecilomyces*, ya que muchas de las veces se aprovecha material de desecho agrícola. Por esta razón varios ajustes y mejoras pueden ser alcanzados con una mayor investigación sobre el tema. Esto podría traer como consecuencia una mayor concentración final de conidias, haciendo más rentable la elaboración y más eficaz las aplicaciones (Gao y Liu, 2010).

1.2 Justificación

En la actualidad el uso de pesticidas está trayendo consigo serios efectos negativos a los ecosistemas y afectan de manera directa a todos los humanos. Estudios de los principales ríos y arroyos en los Estados Unidos muestran que el 96% de todos los peces, 100% de todas las muestras de agua superficial y 33% de los acuíferos contienen uno o más plaguicidas en niveles detectables (EPA, 2005). Así mismo, se calcula que cada año alrededor del mundo tres millones de personas presentan intoxicaciones graves y agudas

debido a plaguicidas, de los cuales el 90% ocurren en países en vías de desarrollo (McConnell, Henao, y otros, 1993). Sin embargo, estos casos son ejemplos solamente de efectos agudos. Los efectos crónicos por otro lado, se observan a largo plazo y normalmente son el resultado de varias exposiciones, pero a cantidades pequeñas. Esto puede traer efectos neurológicos, trastornos reproductivos, efectos cutáneos, trastornos inmunológicos, lesiones hepáticas, cáncer, problemas mutagénicos, tetragénicos, entre otros (Gonzales y Albert, 2004). Por otro lado, la persistencia de varios compuestos activos de pesticidas puede ser de varios años, acumulando así mayores concentraciones en el ambiente. Varios estudios han demostrado que estos compuestos pueden ser almacenados en tejidos adiposos y que pueden ser encontrados en leche materna un largo tiempo después de la exposición al producto (Gómez, Martínez, y otros, 2013). Por estas razones es muy importante reducir el empleo de pesticidas químicos, evitando así una mayor contaminación del ambiente y limitando los efectos negativos sobre la salud.

Sin embargo, la producción agrícola debe continuar para lograr alimentar a los pobladores del mundo. Por esta razón, es importante que se utilicen controles de plagas amigables con el ambiente que permitan reducir las pérdidas del cultivo de una manera económica y sustentable. Y es aquí, donde entra la utilización del organismo benéfico, ya que cumple con los requisitos anteriormente mencionados (Elósegui, 2006). El hongo *P. lilacinus* es de los organismos frecuentemente utilizados en el control biológico. Este microorganismo produce y libera conidias que parasitan nemátodos, reduciendo así las poblaciones de plagas potenciales. El aspecto positivo de este método de manejo es que es preventivo, a comparación de la mayoría de métodos químicos que normalmente son aplicados al encontrar una incidencia alta de la plaga. Tratándose de un ser viviente, es posible incubar cepas de este organismo y multiplicarlo para lograr elaborar un producto que sea posible aplicar sobre el cultivo (Luangsa-ard, et al., 2011). Varios manuales para la

producción artesanal de *P. lilacinus* han sido creados, sin embargo estos varían mucho en cuanto a tecnificación de equipos y componentes de los sustratos. No obstante, la finalidad de todas estas es producir una concentración final de conidias, la cual pueda ser empleada para uso agrícola. Por esta razón, es importante realizar un estudio que analice los efectos de la concentración de carbono y la relación C:N sobre la producción final de conidias para lograr una mayor eficiencia de producción.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar los efectos de diferentes concentraciones de carbono y relación C:N sobre la concentración final de conidias de *Paecilomyces lilacinus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración de carbono y la relación C:N más eficiente para la cantidad final de conidias de *P. lilacinus*.
- Evaluar el efecto que tiene la concentración de carbono sobre la cantidad final de conidias.
- Evaluar el efecto que tiene la relación C:N sobre la concentración final de conidias.

3. Hipótesis

La concentración de carbono y la relación C:N influyen de manera directa en la cantidad final de conidias de *Paecilomyces lilacinus*.

4. Revisión de Literatura

4.1 Métodos de control

4.1.1 Manejo de plagas

Existe una gran variedad de actividades para el control de plagas que son utilizadas dependiendo de las diferentes condiciones y el cultivo. Sin embargo, éstas se pueden

agrupar en cuatro principios generales: evasión, exclusión, erradicación y protección (Achicanoy, 2001). Las prácticas que involucran la evasión de enfermedades buscan impedir la acción de organismos dañinos por medio del uso de características agroclimáticas o geográficas principalmente. Los ejemplos más comunes son la selección de temporadas de siembra, sitios de siembra debido a características topográficas o características del suelo. Por otro lado, la exclusión busca evitar la introducción del inóculo a los sitios de cultivo. Para esto, todo material vegetativo debería ser evaluado en cuarentena o tener una certificación de que es un material libre de patógenos. Además es muy importante tener un control riguroso de las personas, equipos y maquinarias que ingresan a los campos de cultivo y así asegurarse de que no estén transportando algún tipo de inóculo. La erradicación del patógeno abarca estrategias destinadas a la reducción de poblaciones o a la eliminación de un patógeno dado. Para esto se pueden utilizar plaguicidas químicos, rotación de cultivos, erradicación de plantas huésped, entre otras. Finalmente, la protección comprende toda actividad que busque evitar el ataque a las plantas de una manera preventiva, pudiendo utilizar agentes químicos o cualquier tipo de barrera infecciosa (Fry, 2002).

4.2 Nemátodos

4.2.1 Importancia y descripción

Los nemátodos son un grupo muy importante dentro de los animales multicelulares. Pertenecen al filo *Nematoda*, cuyas raíces proviene del griego que significa hilo. Existe una gran diversidad dentro de esta agrupación, siendo considerados las criaturas más abundantes de la tierra. La mayoría de estos organismos son marinos, sin embargo, los nemátodos tienen varios ejemplares que se encuentran muy bien adaptados a la tierra. Estos se pueden encontrar en una gran variedad de ecosistemas, especialmente en climas

tropicales y subtropicales, y se interrelacionan con la fauna presente en el edafón. Por esta razón, los nemátodos interactúan directamente con los cultivos (Triviño, 2003). Existen nemátodos benéficos que se alimentan de bacterias, hongos y otros nemátodos. Sin embargo también existen nemátodos perjudiciales para los cultivos, ya que se alimentan de los tejidos de plantas creando repercusiones negativas sobre los cultivos. Estos últimos pueden ser clasificados como nemátodos del nudo de la raíz, enquistados, punzantes y de raíces lesionadas (Food and Agriculture Organization, 2013). En varios cultivos, los nemátodos llegan a ser una plaga bastante seria causando cuantiosos daños en siembras de uso agrícola. Se estima que a nivel mundial, se pierde alrededor de un 12% en rendimientos de cultivos debido a estos organismos, lo que representaría alrededor de 78 billones de dólares anuales (Ramírez, 2012). Hasta el momento se han descrito por lo menos 2500 especies diferentes de nemátodos que son considerados plaga. La gran mayoría de estos organismos ataca a las raíces de los organismos hospederos, sin embargo, algunos pueden causar daños en otros tejidos como en las hojas y flores. Sin embargo debido a que su presencia es predominantemente en el suelo, estas plagas son consideradas uno de los problemas más complicados de identificar, demostrar y controlar en campo. Los géneros que mayor influencia tienen en la agricultura son: *Meloydogyne*, *Heterodera*, *Pratylenchus*, *Radopholus*, entre otros (Food and Agriculture Organization, 2002).

Los nemátodos son organismos microscópicos con aspecto vermiforme y pseudocelomados. Habitan en el suelo dentro de laberintos de poros interconectados, y se mueven en las capas de agua adheridas a las partículas del suelo. Normalmente habitan en grandes densidades, las cuales pueden llegar a ser de hasta 10 millones de individuos por metro cuadrado de suelo. Los nemátodos son sexuados y su fisiología es diferenciada dependiendo del sexo. Por lo general, los ejemplares macho son más pequeños que las hembras, lo cual es conocido como dimorfismo sexual. Estos organismos son

estructuralmente simples y miden desde 0.2 mm hasta más de 8 metros de largo en algunas especies, sin embargo, la gran mayoría miden menos de 2.5 mm (Christie, 1991). Si bien es cierto que existe una gran diversidad de nemátodos en el mundo, éstos conservan una sorprendente uniformidad estructural. Estos son vermiformes alargados, no segmentados, de cuerpo delgado que se van achatando hacia los extremos (Figura 2). No existe una cabeza diferenciada, por lo que el cerebro se ubica en la parte anterior del cuerpo, mientras que todos sus órganos sensoriales se encuentran concentrados en el tejido circundante a la invaginación bucal. La estructura corporal de los nemátodos está dividida en tres secciones que son la sección encefálica, la del esófago y la región caudal (Román y Acosta, 1991).

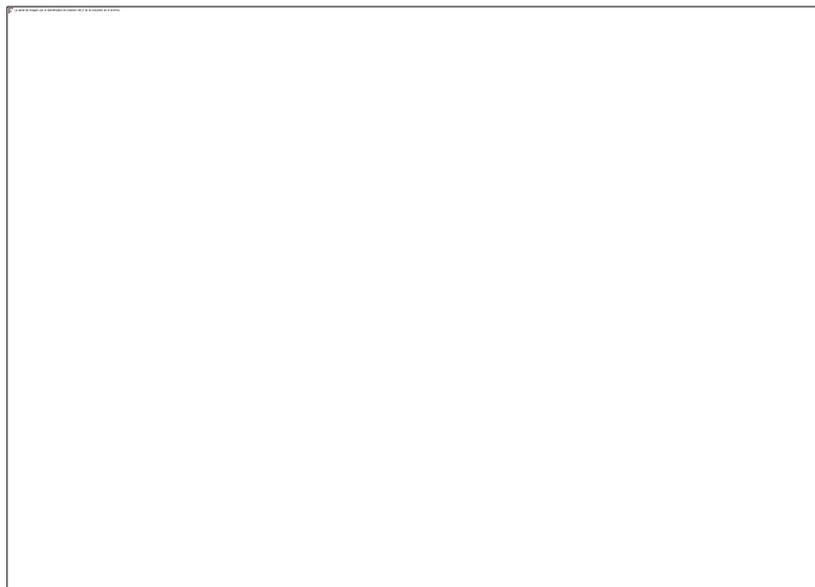


Figura 1. Morfología de ejemplares macho y hembra de nemátodos
(Coyne, Nicol, y otros, 2009)

4.2.2 Ciclo biológico de los nemátodos

Todo nematodo tiene un ciclo biológico que consiste de seis estadios los cuales son: huevo, cuatro estadios juveniles (J1, J2, J3, J4) y adulto (Figura 4). En este último, es donde se desarrollan y se vuelven funcional las estructuras reproductivas. Muchas de las

especies de estos organismos tienen un cambio bastante significativo en la cutícula al llegar al estadio J3, brindando a estos animales una mayor resistencia al ambiente en comparación con las anteriores fases. Esto es un factor primordial que se debe tomar en consideración, si lo que se quiere es controlar a nemátodos que se encuentran en el edafón del suelo (Chitiwood y otros, 2009). Para la mayoría de los nemátodos parásitos de plantas, el ciclo comienza con la inseminación de un nematodo hembra, la cual desarrolla y deposita huevos fecundados. El estadio J1 normalmente se desarrolla en el interior del huevo y la primera muda también ocurre dentro de esta estructura. La eclosión del huevo sucede en los juveniles J2, cuando salen al ambiente y suceden las mudas respectivas hasta convertirse en adultos. En esta fase los nemátodos tienen la habilidad de atacar e invadir a plantas, y normalmente ingresan por el tejido radicular para luego ubicarse en el córtex de la raíz produciendo daños considerables en el tejido. En el caso de las hembras, los ejemplares en el estadio J3 se adentra en los tejidos, donde busca un lugar para acomodarse el resto de su vida. Por otro lado, los machos se ubican justo debajo de la epidermis de la raíz y una vez que entran a J4 salen al edafón en búsqueda de una hembra (Figura 5) (Lee, 2005).

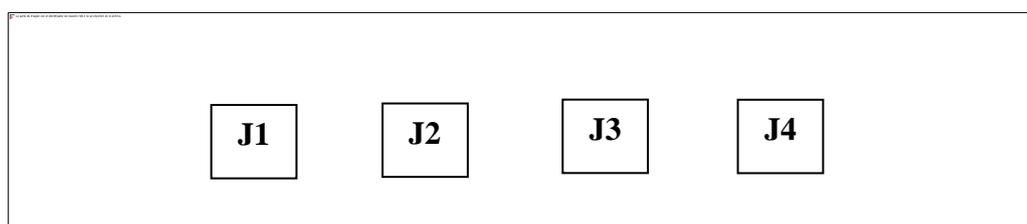


Figura 2. Estadios del ciclo de vida de un nematodo (Lee, 2005)



Figura 3. Ciclo de vida de *Meloidogyne* 1) Larvas entran a raíz, 2) Larvas se fijan en la raíz, 3) Inicio de formación de agallas, 4) Agalla con macho y hembra en formación, 5) Agalla y hembra con masa de huevos; A) Larvas, B) Hembra en formación, C) Macho en formación, D) Hembra joven, E) Macho joven, F) Hembra adulta, G) masa de huevos, H) Macho adulto (López, 2009)

4.2.3 Métodos de control y manejo

El control y manejo de nemátodos es bastante complicado por medios convencionales, ya que normalmente cuando el agricultor nota señales de estrés en el cultivo la plaga ya está establecida. Hace algunos años se desarrollaron productos sintéticos que se han comercializado como nematicidas o fumigantes del suelo, sin embargo, éstos han perdido seguidores debido a su baja eficiencia y especificidad, y también debido a sus altos grados toxicidad y de residualidad (Stirling, 2014). Una de las técnicas utilizadas es la fumigación de suelos en la cual se inyectan químicos en el edafón. Los productos químicos más utilizados para la fumigación del suelo son metam sodio, metam potasio, bromuro de metilo y dicloropropeno. Por otro lado, como nematicidas se emplea normalmente carbofuran, terbufos, cadusafos entre otros. Sin embargo, el control de huevos de nematodo con esta técnica es bastante ineficiente (Cantuña, 2013). Por estas razones es recomendable

utilizar métodos preventivos para lograr controlar las poblaciones de nemátodos, ya que es virtualmente imposible tener un suelo libre de estos organismos. Entre las técnicas más usadas están las estrategias de control cultural, las cuales emplean técnicas de barbecho, inundación, aplicación de abono orgánico, cultivos de cobertura, rotación de cultivos, utilización de variedades resistentes, entre otras (García M. , 2007).

En los últimos años han tomado fuerza los métodos de biológicos. Para ello, se introduce deliberadamente organismos que son enemigos naturales de los nemátodos, logrando así controlar y reducir las poblaciones de la plaga a niveles que no tengan efecto económico adverso. Estos organismos son conocidos como agentes de control biológico, y abarcan una gran variedad organismos que pueden ser hongos, virus, insectos, bacterias o incluso nemátodos (Rodríguez, 2001). Los hongos nematófagos son microorganismos que tienen la capacidad de atacar, matar y digerir diferentes estadios de nemátodos. Además, varios de estos hongos logran sobrevivir de manera saprofítica en la materia orgánica del suelo. Estos organismos están divididos en cuatro grupos dependiendo del modo en que infecta a los nemátodos. Estos son hongos atrapadores de nemátodos, endoparásitos, hipomicetes y productores de toxinas. Sistemas de producción y aplicación de estos organismos benéficos siguen siendo desarrollados para lograr sistemas de control más eficientes, económicos y sustentables (Naranjo, 2008). Una de las alternativas principales es el hongo *P. lilacinus*, el cual es un eficiente controlador de nemátodos.

4.3 *Paecilomyces lilacinus*

4.3.1 *Caracterización general*

P. lilacinus es un hongo presente en la mayoría de suelos, presentándose en una mayor concentración en suelos subtropicales y tropicales. Este organismo pertenece a la división *Ascomycota*, clase *Sordariomycete* y familia *Ophiocordycipitaceae*. Clasificaciones

actuales de este hongo hifomiceto lo están catalogando dentro la sección de las *Isarioidea*. Los hongos de este grupo se caracterizan por tener conidióforos complejos y el hábito de parasitar insectos y otros organismos, ya que no se lo ha encontrado en forma perfecta. Debido a esta nueva organización taxonómica, el nuevo nombre científico de este hongo es *Purpureocillium lilacinum*, sin embargo, su nombre original sigue siendo comúnmente utilizado (Luangsa-ard, et al., 2011). Este organismo es normalmente saprófito y produce un espeso micelio de dónde se forman los conidióforos que producen las conidias. La producción de conidióforos, y por ende la concentración final de conidias, puede verse afectado o estimulado dependiendo de la concentración de humedad y la disponibilidad de nutrientes. Sus hifas normalmente poseen una textura lisa y presentan un espesor entre 3 y 5 μm . A partir de estas estructuras se levantan conidióforos que pueden llegar a tener hasta 650 μm , los cuales producen conidias con carácter fusiforme (Figura 6). El crecimiento y desarrollo del hongo es posible entre las temperaturas de 8 a 38 °C, teniendo un crecimiento óptimo entre 26 y 30 °C (Tigano y Inglis, 2006). Este organismo es reconocido por ser un eficiente controlador biológico que parasita varios nemátodos que son plagas de distintos cultivos. Entre estos destacan los géneros *Meloidogyne*, *Radopholus*, *Pratylenchus* *Heterodera*. y *Globodeera*. Aunque este hongo es más agresivo contra huevos de nemátodos también se ha visto que parasitan a nemátodos móviles y a hembras sedentarias. Por esta razón es que este hongo está siendo desarrollado comercialmente como un agente de control de plagas (Inglis, Tigano, y otros, 2000)



Figura 4. Conidióforos de *Paecilomyces lilacinus* (Carranza, 2014)

4.3.2 Ciclo biológico

El ciclo biológico de hongos imperfectos comprende cinco pasos principales los cuales son: dormancia de las conidias, germinación, infección, desarrollo de micelio y conidiogénesis. El desarrollo de micelio y producción de conidios viables está directamente relacionado con la disponibilidad de fuentes de nitrógeno y carbono, además del método de inoculación, salinidad del sustrato, relación carbono/nitrógeno, aireación, contenido de humedad, entre otros. Los conidióforos son caracterizados por tener un reducido movimiento de agua, ausencia de movimiento citoplasmático y una baja actividad metabólica. Bajo condiciones favorables, las conidias germinan formando un tubo vegetativo, el cual será la base para el futuro micelio (Brand, Soccol, y otros, 2010).

4.3.3 Modo de Acción

El hongo *P. lilacinus* ataca principalmente a los estadios sedentarios y juveniles de nemátodos. Es importante saber que los huevos de los nemátodos fitopatógenos están compuestos normalmente de tres capas diferentes que son: la vitelina que está compuesta principalmente de proteínas, el tejido medio que está constituido de quitina y el tejido

interior que está hecho de lipoproteínas (Brand, Soccol, y otros, 2010). Para comenzar la colonización, las conidias comienzan a desarrollar hifas, las cuales forman un amplio canal de células que recubre el huevo del nematodo. Una vez establecido, las puntas de las hifas se hinchan y forman apresorios que permiten la penetración de la hifa dentro del huevo (Figura 7). Esto es logrado gracias a actividad mecánica y enzimática, en donde están involucradas algunas proteasas y quitinasas. La enzima serina proteasa actúa directamente sobre la degradación de la superficie del huevo, mientras que la quitinasa actúa liberando amonio de la descomposición de quitina y fomentando la población de microbiota quitolítica, las cuales paralizan el crecimiento de los huevos (Morton y Mukerji, 2004). Otros estudios han demostrado que el proceso de infección comienza con la adhesión de la hifas al huevo con ayuda de hidrofobinas. Las hidrofobinas son una familia de proteínas hidrofóbicas provenientes de hongos, que se caracterizan por la capacidad de unirse a una interface hidrolítica/hidrofóbica por medio de la formación de una pequeña capa anfipática (Pedrós, 2004). Mientras continua la penetración, el tejido vitelino del huevo comienza a dividirse en tres bandas y se forman varias vacuolas. Después de la penetración al huevo, se produce un gran crecimiento de hifas que destruyen a los individuos que yacen dentro de esta estructura. Finalmente, una gran cantidad de conidióforos son producidos y el hongo comienzan a expandirse hacia huevos adyacentes. Por otro lado, *P. lilacinus* produce toxinas que afectan el sistema nervioso y causan deformaciones en el estilete de los nemátodos sobrevivientes (Hassan, 2015).

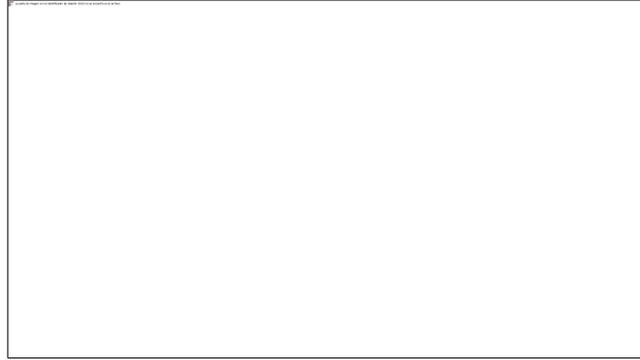


Figura 5. Hifas de *Paecilomyces lilacinus* parasitando huevos de *Meloidogyne* spp.
(Carranza, 2014)

5. Materiales y Métodos

Este experimento se realizó en el laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos 2 ubicado en la Universidad San Francisco de Quito. Para esta investigación se evaluaron nueve tratamientos diferentes para la incubación del hongo *Paecilomyces lilacinus* (P-1), con fines de uso agrícola. La variable bajo estudio fue la concentración final de conidias y los tratamientos difirieron en cuanto a dos factores, los cuales tuvieron tres niveles cada uno. El primer factor fue la concentración de carbono, mientras que el segunda factor fue la relación C:N. Como fuente de carbono se utilizó azúcar, la cual tiene una concentración del 40% de carbono. Así mismo, como fuente de nitrógeno se utilizó urea, la cual presenta una concentración del 46% de este elemento. Los sustratos tuvieron una concentración estandarizada de arrocillo, cascarilla de arroz, carbón triturado y caldo base. Para realizar las observaciones se esperó un periodo de 14 días donde las muestras estuvieron dentro de una incubadora. Las concentraciones y métodos serán explicados en mayor detalle más adelante.

5.1 Diseño estadístico

La evaluación de concentración de carbono y relación C:N sobre la producción final de conidias *P. lilacinus* tuvo el fin de encontrar las concentraciones óptimas que fomenten la producción de conidias. Para este experimento se optó por un diseño estadístico completamente al azar con arreglo factorial 3^2 el cual contiene 9 tratamientos con dos factores y se realizaron 15 repeticiones por muestra. El factor A evaluó la concentración de carbono, y el factor B evaluó la relación carbono/nitrógeno. Los tratamientos estudiados fueron los siguientes:

		Factor A		
		Tratamiento A1 (10 g/L)	Tratamiento A2 (20 g/L)	Tratamiento A3 (30 g/L)
Relación C:N				
Factor B	B1 20:1	x	x	x
	B2 30:1	x	x	x
	B3 40:1	x	x	x

Tabla 1. Disposición de los tratamientos

La variable de respuesta fue el número de conidias observadas en diluciones estandarizadas. Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de ANOVA y como existió una $p \leq 0.05$ se procedió con un análisis de datos utilizando una prueba de diferencia significativa honesta de Tukey para observar si es que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

5.2 Inóculo inicial

La cepa fue obtenida del cepario de la Universidad San Francisco de Quito. Este fue inoculado en una caja Petri la cual contenía un medio PDA. Se dejó reposar hasta que toda la superficie estuvo cubierta de micelio.

Para el inóculo inicial se utilizó 80 g de arroz comercializado en supermercado, este se lavó varias veces hasta que estuvo libre de todo residuo y limpio. Después se dejó remojar el arroz durante un periodo de 10 min. Se tamizó todo el arroz y se dejó reposar hasta cuando dejó de gotear todo el líquido en exceso. Se llenó 2/3 de un frascos de vidrio que tenían un volumen de 300 mL, y se agregó agua destilada en una proporción 20 mL de agua destilada por cada 80 g de arroz. A esta mezcla se la dejó reposar por alrededor de 30 minutos agitando constantemente el frasco para distribuir equitativamente la humedad. Pasado este tiempo, se esterilizó los frascos con la ayuda del autoclave, el cual fue corrido a 121 °C, a 1 atmósfera durante 20 minutos. Fue necesario esperar que los recipientes y sus contenidos se enfríen a temperatura ambiente antes de proceder al siguiente paso. Además, fue necesario esterilizar los utensilios que se manejaron para la inoculación. Las herramientas e implementos utilizados fueron una micropipeta, un bisturí y agua destilada.

Luego, todos estos elementos fueron transferidos a la cámara de flujo laminar, la cual había sido esterilizada por medio de un tratamiento de 30 minutos de luz ultra violeta y limpiada con etanol al 90%. La higiene personal también es importante en este proceso, por lo que se lavó las manos y antebrazos con agua y jabón para posteriormente frotar un poco de alcohol sobre la piel. La cámara de flujo fue prendida y se encendió el mechero en su interior, después fueron desinfectados con etanol las boquillas de todos los recipientes. Para la inoculación se tomó alrededor de 2 mL de agua destilada con la micropipeta y se procedió a depositarla dentro en la caja Petri que contenía PDA en donde había una. Se

utilizó un bisturí para hacer un raspado del medio para lograr retirar las estructuras del hongo de la superficie. Este raspado fue de manera delicada y solo superficial. La caja Petri fue inclinada de manera que todo el líquido, que contenía las estructuras del hongo, se acumule y facilite la recolección. Esta solución fue recolectada con la micropipeta y fue transferida a los recipientes de vidrio que contenían el arroz. Se tapó el recipiente y fue transferido a la incubadora, donde se esperó tres semanas para que exista crecimiento micelial y se produzcan de esporas. Durante estas tres semanas, se revisó periódicamente para asegurar de que los medios no presenten ninguna contaminación.

5.3 Caldo base

En este experimento el caldo base fue uno de los componentes del sustrato. Este consto de una solución que brindaba humedad al sustrato además de aportar nutrientes esenciales para el desarrollo del hongo. Este caldo estaba formulado a base de agua destilada a la cual se le agregó concentraciones de 10 g/L de fosfato dipotásico, 5 g/L de cloruro de potasio y 5 g/L de sulfato de magnesio. Este caldo además sirvió para diluir las diferentes concentraciones carbono y nitrógeno que fueron agregados a los sustratos. Se hizo esto para lograr distribuir de una manera más eficiente estos elementos y se añadió al sustrato una vez homogenizado. El azúcar y la urea fueron disueltas en un vaso de precipitación con la ayuda de un agitador magnético durante un periodo de 2 minutos.

5.4 Preparación de sustrato

Los sustratos son el medio sobre el cual crece y se desarrolla el hongo, el cual en este caso es *P. lilacinus*. Para este experimento se utilizó sustrato formulado a base de arrocillo, cascarilla de arroz y carbón triturado. La relación de estos componentes fue de 1.2: 1.0: 0.6 respectivamente. Todos estos elementos fueron mezclados hasta que el sustrato esté homogenizado. Se preparó suficiente sustrato para rellenar 45 fundas de muestra las cuales

contenían 150 g de muestra. A la mezcla inicial se le separo en nueve porciones, a cuales representaron a los 9 tratamientos diferentes. A cada tratamiento, se les agregó 225 mL de caldo base. Sin embargo, antes de agregar el caldo base diferentes cantidades de azúcar y urea fueron disueltas, las cuales correspondieron a las concentraciones de carbono y la relación C:N. Los datos exactos de las cantidades de azúcar y urea agregadas pueden ser observados en la Tabla 2. Una vez más el sustrato tuvo que ser homogenizado antes de enfundar 150 g de muestra. Se utilizó bolsas polyfan y se las cerró con una liga para restringir el ingreso y la salida de elementos. Cada muestra fue etiquetada con un código dependiendo del tratamiento al que pertenecía. Una vez preparadas todas las muestras se las esterilizó en un autoclave, a 121°C y a 1 atmósfera durante 20 minutos. Es importante esperar que los sustratos estén a temperatura ambiente antes de seguir al siguiente paso.

Para los tratamientos se utilizaron tres concentraciones de carbono las cuales fueron 10 g/L, 20 g/L y 30 g/L. A su vez, se decidió evaluar tres diferentes relaciones de C:N, a cuales fueron 20:1, 30:1 y 40:1. Las cifras dadas en la Tabla 2 están calculadas para 225 mL de caldo base y considerando que el azúcar tiene una concentración del 40% de carbono y que a su vez la urea tiene una concentración de 46% de nitrógeno.

Relación C:N	Elementos	Tratamiento A1 (10 g/L)	Tratamiento A2 (20 g/L)	Tratamiento A3 (30 g/L)
B1 (20:1)	Azúcar	5.63 g	11.26 g	16.89 g
	Urea	.244 g	.489 g	.733 g
B2 (30:1)	Azúcar	5.63 g	11.26 g	16.89 g
	Urea	.163 g	.326 g	.489 g
B3 (40:1)	Azúcar	5.63 g	11.26 g	16.89 g
	Urea	0.122 g	.244 g	.366 g

Tabla 2. Cantidades de azúcar y urea agregados en los diferentes tratamientos (diluidos en 225 mL de caldo base)

5.5 Inoculación del sustrato

Para la inoculación de sustrato fue necesario tener el inóculo madre completamente cubierto de micelio de *P. lilacinus*. Una vez logrado esto se esterilizó una jeringa en el autoclave a una temperatura de 121°C, a 1 atmósfera y durante 20 minutos. Además, la cámara de flujo se esterilizó con un tratamiento de 30 minutos de luz ultravioleta y posteriormente fue limpiada con etanol al 90%. Los sustratos fueron transferidos a la cámara de flujo laminar al igual que 180 mL de agua destilada con Tween 80 al 1% y una jeringa. Se traspasó 50 g del inóculo madre a un vaso de precipitación de 500 mL, que contenía los 180 mL de agua destilada estéril con Tween 80 al 1%, la cual ayuda a la separación y suspensión de las conidias. Se agitó suavemente toda la mezcla durante tres minutos con la ayuda de un agitador magnético a fin de solubilizar la mayor parte de conidias posibles. Con la ayuda de la jeringa se absorbió la solución y se dispensó 3 mL del líquido dentro de cada muestra. Cada funda fue sellada posicionando un algodón en la apertura de la funda y enrollando una liga a su alrededor para permitir el intercambio de gases, pero limitando el intercambio de partículas más grandes. Una vez inoculadas todas las muestras, estas fueron transferidas a la incubadora.

5.6 Incubación del sustrato

Los sustratos inoculados fueron transferidos a una incubadora en donde permanecieron 14 días a una temperatura de 28 °C y con un constante intercambio de aire. Las fundas fueron ubicadas de forma homogénea, pero al azar dentro de la incubadora. A los siete días de comenzada la incubación, se amasó las fundas para homogenizar las fuentes de inóculo y lograr un crecimiento más uniforme del hongo.

5.7 Extracción y conteo de conidias

Una vez acabado el periodo de incubación se procedió a sacar las muestras de la incubadora y a reagruparlas según el tratamiento. Se preparó y transfirió a la cámara de flujo dos vasos de precipitación esterilizados, un contenedor con una solución de agua destilada que contenía Tween 80 al 1%, una micro pipeta con varias puntas, una balanza y la cámara de Neubauer. Cada funda fue volteada y homogenizada una última vez antes de extraer una muestra de 15 g, la cual fue depositada dentro de un recipiente que contenía 135 mL de agua destilada con una concentración de Tween 80 al 1%. La mezcla fue agitada durante dos minutos con la ayuda de un agitador magnético para posteriormente extraer 1 mL de la solución y depositarla en un segundo envase que contenía 9 mL de agua destilada, logrando una dilución seriada de 1×10^{-1} . Esta solución fue agitada por 1 minuto con la ayuda de un agitador magnético. Por otro lado se agregó 10 μL de azul de metileno en el canal central del cámara de Neubauer para después colocar el cubre objetos. Con la micropipeta se recolectó 190 μL de la segunda dilución y se la dispense lentamente a 0.3 cm por encima del inicio del cubre objetos, esperando que por el efecto de la capilaridad el líquido sea transportado debajo del cubre objetos.

Una vez preparada la muestra, se llevó el cámara de Neubauer bajo un microscopio para su observación. Se utilizó el lente de 65x para contar el número de conidias dentro de un cuadrante de 0.2 mm x 0.2 mm x 0.1 mm (0.004 mm^3). Este proceso de preparación de la dilución seriada se repitió en tres ocasiones por cada muestra (5 muestras por tratamiento) para obtener un total de 15 observaciones por tratamiento y 135 datos en total.

Los datos del conteo inicial, estos estaban expresados en concentración de conidias por 0.004 mL en una dilución seriada 1×10^{-1} . Para transformar los datos en concentración de

conidias por gramo de muestra fue necesario utilizar una fórmula de conversión (BRAND, 2015).

$$\frac{\# \text{ conidias}}{g \text{ de muestra}} = \frac{\text{partículas contadas}}{\text{superf. conteo (mm}^2) \times \text{profundidad de cámara (mm)} \times \text{dilución}} \times 10^4$$

En la fórmula la superficie de conteo fue de 0.04 mm², la profundidad de la cámara fue de 0.1 mm y la dilución fue de 1/10.

6. Resultados

Todos los datos recopilados utilizando la cámara de Neubauer fueron organizados según su tratamiento (Anexo 6). Es importante saber que los datos que se observan son la concentración final de conidias por 0.004 mL de una dilución seriada de 1x10⁻¹. Se realizaron 3 observaciones por muestra por lo que obtuvo un total de 15 observaciones por tratamiento. Las medias de los tratamientos puede ser observados en la Tabla 3.

		Factor A			
		1 (10g/L)	2 (20 g/L)	3 (30 g/L)	Σ
Factor B	1 (20:1)	17.20	39.33	58.67	115.20
	2 (30:1)	27.80	30.80	48.67	107.27
	3 (40:1)	15.00	34.20	83.93	133.13
	Σ	60.00	104.33	191.27	355.60

Tabla 3. Valores Medios de los tratamientos (# de conidias / 0.004 mL)

Una vez obtenidos los datos iniciales, fue necesario utilizar la fórmula de conversión anteriormente descrita para lograr calcular la concentración de conidias por gramo de muestra. Los datos de cada observación transformados a números de conidia por gramo de substrato se pueden apreciar en la Anexo 9, mientras que las medias de cada tratamiento en esta misma unidad pueden ser observadas en la Tabla 4.

	Factor A			
	1 (10 g/L)	2 (20 g/L)	3 (30 g/L)	
Factor B	1 (20:1)	4.30E+08	9.83E+08	1.47E+09
	2 (30:1)	6.95E+08	7.70E+08	1.22E+09
	3 (40:1)	3.75E+08	8.55E+08	2.10E+09

**Tabla 4. Valores medios de los tratamientos
(Concentración de conidias / g de muestra)**

Una vez obtenido y tabulado los datos, se realizó un análisis de variancia acorde al diseño completamente al azar con arreglo factorial 3^2 , tomando en cuenta una $p < 0.05$ en búsqueda de comprobar la hipótesis de que la concentración de carbono y la relación C:N afectan a la concentración final de conidias de *P. lilacinus*.

FV	GL	SC	CM	F calculado	F tabular
Total	134	4.10E+19			
Tratamiento	8	3.53E+19	4.41E+18	97.63	2.01
A	2	2.79E+19	1.39E+19	308.41	3.07
B	2	1.10E+18	5.49E+17	12.15	3.07
AB	4	6.32E+18	1.58E+18	34.98	2.44
Error Experimental	126	5.69E+18	4.52E+16		

Tabla 5. ANOVA de diseño completamente al azar con arreglo factorial 3^2 ($p < 0.05$)

CV = 21.52%

Sy = 54882430.06

Sd= 77615476.92

Los resultados de la prueba de ANOVA demostraron que los datos son aceptables ya que el coeficiente de variación (CV) resulto ser del 21.52%. Además, esta prueba demostró que

la concentración de carbono (Factor A) tiene un efecto significativo en la producción de conidia ($F=308.41$; $p < 0.05$). Así mismo, la relación C:N (Factor B) manifestó tener efectos significativos sobre la variable dependiente ($F= 12.15$; $p < 0.05$). Finalmente, la interacción entre las dos variables anteriormente mencionadas (Factor A x Factor B) también demostró tener un efecto significativo sobre la concentración final de conidias en este hongo.

Una vez obtenido los datos del ANOVA, se elaboró una tabla con las medias de los tratamientos para poder realizar una prueba de diferencia significativa honesta de Tukey al 5% para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los nueve tratamientos.

Tratamiento	A3B3	A3B1	A3B2	A2B1	A2B3	A2B2	A1B2	A1B1	A1B3
Media	2.10E+09	1.47E+09	1.22E+09	9.83E+08	8.55E+08	7.70E+08	6.95E+08	4.30E+08	3.75E+08
	a	b	c	cd	de	de	e	f	f

Tabla 6. Prueba de Tukey al 5% para producción de conidias

Una vez realizada la prueba de diferencia significativa honesta de Tukey al 5%, se logró determinar numéricamente si existe una diferencia estadística entre los nueve tratamientos. La diferencia honestamente significativa (HSD) resultó ser de $2.41E+08$ indicando que el tratamiento más eficiente resultó ser el A3B3 teniendo una concentración final de $2.10E+09$ conidias por gramo de muestra. Su concentración final de conidias fue superior al segundo tratamiento más eficiente, ya que la diferencia fue más que el doble del valor crítico calculado. El segundo tratamiento más eficiente en cuanto a la concentración final de conidias fue A1B1, el cual obtuvo una concentración de $1.47E+09$. Los tratamientos A3B2 y A2B1 no mostraron tener una diferencia significativa logrando alcanzar una concentración final de conidias de $1.22E+09$ y $9.83E+08$ respectivamente. A su vez, el tratamiento A2B1 no demostró tener una diferencia significativa con respecto a

A2B3 y A2B2 que lograron alcanzar una concentración final de conidias de $8.55E+08$ y $7.70E+08$ respectivamente. No obstante, el tratamiento A2B3 no demostró tener una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los tratamientos A2B2 y A1B2, los cuales lograron una concentración final de conidias de $7.70E+08$ y $6.95E+08$ respectivamente. El tratamiento con la menor concentración final de conidias fue A1B3 con un promedio de $3.75E+08$ conidias, sin embargo, este tratamiento no demostró tener una diferencia significativa con respecto a A1B1 que produjo una concentración final de conidias de $4.30E+08$.

7. Discusión

El hongo *P. lilacinus* es un excelente controlador biológico usado principalmente para el control de nemátodos. Este hongo se caracteriza por parasitar estadíos de huevo con la ayuda de la formación de micelio. Sin embargo, este micelio se desarrolla una vez que la conidia está cerca a esta estructura (Vigueras, Shirai, y otros, 2014). Por ende, para tener una buena efectividad en el proceso de supresión de plaga, es muy importante contar con altas concentraciones de conidia para la aplicación. Varios estudios han demostrado que los sustratos que se utilizan para el proceso de producción de este hongo afectan el comportamiento de este organismo. Se ha descubierto que la cantidad de nitrógeno disponible para la nutrición del hongo afecta directamente sobre el desarrollo micelial. Sin embargo, es importante resaltar que la relación C:N disponible en el sustrato afecta de forma directa en la producción de conidióforos y por ende de conidias (Nieves, Díaz, y otros, 2003). Los niveles óptimos de estos componentes varían entre especies y cepas de cada hongo. Varios estudios han demostrado que se puede fomentar la esporulación de *Aspergillus niger* al agotarse las concentraciones de carbono, mientras que la esporulación en *Aspergillus nidulus* es fomentado por el agotamiento de las concentraciones de

nitrógeno (Nebane y Ekpo, 2002). Otro experimento realizado en China evaluó las concentraciones óptimas de carbono y la relación C:N para fomentar la esporulación de dos cepas de *P. lilacinus*. Los resultados demostraron que las concentraciones óptimas para la cepa IPC-P fue de 12 g/L de carbono con una relación C:N de 20:1, mientras que las concentraciones óptimas para la cepa M-14 fue de 8 g/L de carbono con una relación 10:1 (Gao y Liu, 2010). Como se puede apreciar, cada especie y cepa de hongo tienen requerimientos nutricionales distintos. Por esta razón, es recomendable hacer ensayos con la cepa específica que se planea trabajar en búsqueda de optimización del proceso de producción.

La concentración de carbono presente en los diferentes sustratos jugó un rol importante en la concentración final de conidias. La tendencia de concentración final de conidias indica que a mayor concentración de carbono existe una mayor producción de conidias. Otros estudios indican que la presencia de concentraciones de carbono 8 g/L o mayores inhibieron significativamente la producción de conidias en *P. lilacinus* IPC-P, mientras que la cepa M-14 logró producir altas concentraciones de conidias a concentraciones de 8 g/L y 16 g/L (Gao y Liu, 2009). Se conoce que alrededor de la mitad del peso seco de las células fúngicas se debe al carbono, y por ende su importancia en el ciclo biológico de este organismo. Además, los compuestos orgánicos son la fuente principal de energía para *P. lilacinus*, y es consumido por medio de la glicólisis para la formación de ácido pirúvico. Como se puede apreciar, el carbono es un elemento esencial en el ciclo de vida del hongo (Aguirre, 2006). La sensibilidad a la concentración de carbono varía mucho entre cepas y en este caso presentó un efecto de mayor influencia sobre la producción final de conidias con respecto a la relación C:N.

Por otro lado, el nitrógeno es requerido por los hongos para sintetizar aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos que son necesarios para la formación del protoplasma. La mayor concentración del nitrógeno dentro de un hongo se presenta en forma de proteína. Sin embargo por alguna razón aún desconocida, la relación C:N tiene un efecto directo en la inducción de producción de conidias (Pérez y Ramírez, 2000). El análisis estadístico de los datos demuestra que el factor B (relación C:N) tiene una influencia directa sobre la concentración final de conidias presentes en las diferentes muestras. Sin embargo, en este factor no se tiene una línea de tendencia exacta, ya que la presencia de conidias no fue acorde a los cambios realizados en los diferentes tratamientos. Resultados parecidos fueron obtenidos en la evaluación de diferentes relaciones C:N sobre el hongo *P. lilacinus* IPC-P. Las concentraciones finales de conidias fueron más altas a los extremos de los tratamientos mientras que el valor más bajo se presentaba en el medio de las relaciones C:N. Esto indicaría que el hongo presenta un requerimiento nutricional óptimo, y al realizar cualquier cambio la producción final de conidias se ve afectado. Sin embargo la misma tendencia no fue presentada en la evaluación de la cepa M-14 donde la concentración final de conidias más alta se presentó en el tratamiento que tenía una relación 10:1 (Sun y Gao, 2007). Como se puede apreciar, los requerimientos nutricionales óptimos para la producción de conidias varía y es específico para cada cepa. Otro estudio demostró que las fuentes de carbono y nitrógeno influyen de manera directa sobre la producción final de conidia por lo que es un factor que se debe tomar en cuenta al comparar los diferentes estudios (Sun y Liu, 2006).

La relación entre el factor A y el factor B también demostraron tener una influencia estadísticamente significativa sobre la producción final de conidias en el experimento realizado. Otro estudio realizado sobre 6 hongos diferentes utilizados normalmente en control biológico, entre los cuales habían 2 cepas de *P. lilacinus*, indicó que la relación

entre estos dos factores presentan una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la producción final de conidias. Este demostró que los requerimientos óptimos de la concentración de carbono y la relación C:N son únicos y varían entre las diferentes especies y cepas. Además, este experimento confirmó que las fuentes de nitrógeno y carbono influyen de manera directa sobre el comportamiento de los hongos. Los hongos evaluados fueron *Paecilomyces lilacinus* M-14, *P. lilacinus* IPCP-P, *Metarhizium anisopliae* SQZ-1-21 y RS-4-4, *Lecanicillium lecanii* CA-1-G y *Trichoderma viride* TV-1 (Evans y Black, 2001).

La mayoría de tratamientos demostraron tener una diferencia significativa entre sí lo cual indica que los dos factores analizados juegan un papel muy importante en el desarrollo y producción de conidia. Sin embargo el patrón de concentración final de conidias en las muestras evaluadas no aumentó en relación al aumento de concentraciones. Se podría esperar una tendencia creciente desde A1B1 hasta A3B3, sin embargo no es lo que sucede. Esto afirma que el comportamiento de este organismo ante una nutrición diferenciada, afecta al rendimiento final de producción de conidias y por ende confirma la hipótesis planteada en la investigación. Además apoya a la bibliografía citada anteriormente, la cual dice que la respuesta de estos organismos ante una nutrición depende mucho de la cepa con la que se está trabajando. Esto es debido a que cada cepa tiene un requerimiento óptimo de nutrición. Por esta razón, siempre que se va a trabajar con un hongo es importante realizar estudios de nutrición para lograr optimizar la concentración final de conidias.

8. Conclusiones

- La prueba de diferencia significativa honesta de Tukey demostró acertada la hipótesis planteada en el trabajo, la cual indica que los niveles de carbono y la relación C:N

presente en los medios de cultivo para la producción de *P. lilacinus* influye de manera directa en la concentración final de conidias.

- La prueba de ANOVA demostró que la concentración de carbono presente en los sustratos tiene un efecto directo sobre la concentración final de conidias presentes en la muestras.
- La relación C:N es un factor decisivo en la concentración final de conidias. Sin embargo, este factor no tiene una línea de tendencia fija con respecto a la relación disponible. El valor más alto fue obtenido en la relación 40:1, seguido por la concentración 20:1. La concentración 30:1 presentó la media más baja de concentración final de conidias. El efecto que tiene la relación C:N parece depender de la concentración de carbono disponible. Sin embargo se puede apreciar que la respuesta de esta cepa es mayor a concentraciones altas de carbono y a concentraciones bajas de nitrógeno.

9. Recomendaciones

- Se recomienda medir la humedad relativa de los elementos que componen el sustrato debido a que el hongo *P. lilacinus* es muy susceptible a la concentración de humedad.
- En caso de usar carbón triturado en la mezcla del sustrato, se recomienda homogenizar de manera eficiente la mezcla, ya que las partículas pequeñas tienden a sedimentarse en las fundas. El movimiento y manipulación de las muestras fomenta la sedimentación de estas.
- La incubación de los hongos debería ser sobre una superficie plana para evitar la acumulación de humedad. Además, debe haber espacio entre las muestras para

facilitar el intercambio de gases que es necesario para el metabolismo y desarrollo del hongo.

- A los siete días de incubación es recomendable revolver las muestras para ayudar a dispersar y homogeneizar colonización del medio.
- Todos los instrumentos deben estar apropiadamente lavados y esterilizados para evitar la contaminación de los medios de cultivo. La inoculación y cualquier proceso que involucre la exposición del hongo al aire debería llevarse a cabo dentro de una cámara de flujo laminar.
- Varios estudios han demostrado que las fuentes de carbono y nitrógeno tienen un papel importante en el proceso de producción de conidias. Ciertas fuentes de nitrógeno pueden tener la habilidad de fomentar la producción de estas células sobre ciertos hongos, por lo que una mayor cantidad de estudios deben ser elaborados en búsqueda de optimizar el proceso de producción de *P. lilacinus*.
- Se recomienda en próximos ensayos incluir pruebas de viabilidad de las conidias que es otro factor importante en si se quiere usar este organismo para control biológico.

10. Bibliografía

- Achicanoy, H. (2001). Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 54(1 y 2), 1251-1273.
- Aguirre, N. (2006). Determinación del efecto de algunas fuentes de carbono y nitrógenos, del pH y de la actividad del agua sobre el desarrollo de hongos entomopatógenos. Pontificia Universidad Javierana.
- Benintende, S. (2008). Cátedras de Microbiología Agrícola. Recuperado el 22 de 9 de 2015, de Universidad Nacional de Entre Ríos: http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/parte_de_unidades_10_y_11_microorganismos_del_suelo.pdf
- Benitez, T., Rincón, A., Limón, M., y Codon, A. (2004). Biocotrol Mechanism of *Trichoderma* Strains. *International Microbiology*, 7, 249-260.
- Bongers, T. (2011). Nemaplex. (A. Esquivel, Ed.) Recuperado el 15 de 10 de 2015, de UC Davis: <http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/Courseinfo/Curso%20en%20Español/ManualIdentif%202013.pdf>
- BRAND. (2015). Cámaras de recuento. Recuperado el 05 de 12 de 2015, de http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_s.pdf
- Brand, D., Socol, C., Sabu, A., y Roussos, S. (2010). Production of fungal biological control agents through solid state fermentation: a case study on *Paecilomyces lilacinus* against root-knot nematodes. *Micología Aplicada Internacional*, 1(22), 31-48.

- Cano, M. (2011). Interacción de Microorganismos Benéficos en Plantas: *Trichoderms* spp., *Paecilomyces* spp. y *Pseudomonas* spp. U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica, 14, 15-31. Recuperado el 20 de 09 de 2015, de Universidad de Ciencias Aplicadas: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v14n2/v14n2a03>
- Cantuña, N. (2013). Detección e identificación del nemátodo formador de agallas *Meloidogyne* spp. en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica PCR. Universidad de las Fuerzas Armadas, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Sangolquí.
- Cardelino, D. (2004). Efectos de la aplicación de *Paecilomyces lilacinus* en el control de *Meloidogyne* spp. en pepino. Universidad Zamorano, Ingeniería Agronómica, Honduras.
- Cares, J., y Huang, S. (2012). Nemátodos del suelo. En F. Moreira, J. Huising, y D. Bignell (Edits.), Manual de Biología de Suelos Tropicales (J. Shirley, Trad., 1ra ed., págs. 163-176). Mexico D.F, Mexico: Instituto Nacional de Ecología.
- Carranza, G. (2014). Evaluación in vitro de la patogenicidad del hongo *Paecilomyces lilacinus*. Universidad Rafael Landívar, 16.
- Christie, J. (1991). Nemátodos de los vegetales. En J. Christie, Nemátodos de los vegetales su ecología y control (págs. 1-12). México D.F, México: Noriega Limusa.
- Chtiwood, D., y Perry, R. (2009). Reproduction, Physiology and Biochemistry. En R. Perry, M. Moens, y J. Starr (Edits.), Root-knot nematodes (1ra ed., págs. 182-200). Cambridge, USA: CABI.

- Cogollo, L. (2012). Pesticidas: Salud y Ecosistemas. Revista de la Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, 4, 28-36. Recuperado el 23 de 09 de 2015, de Revista de la Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería: <http://www.unisangil.edu.co/publicaciones/index.php/revista-matices-tecnologicos/article/view/113/108>
- Coyne, D., Nicol, J., y Claudius, B. (2009). Nematología práctica: Una guía de campo. San José: International Institute of Tropical Agriculture.
- Elósegui, O. (2006). Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal.
- EPA. (2005). Pesticides. Recuperado el 24 de 09 de 2015, de U.S. Environmental Protection Agency: <http://www.epa.gov/pesticides/alerts.htm>
- Esser, R., y El-Gholl, N. (1993). *Paecilomyces lilacinus*, a fungus that parasitizes nematode eggs. Florida Department of Agriculture y Consumer Services, Division of Plant Industry.
- Estridge, B., Reynolds, A., y Walters, N. (2000). Basic medical laboratory techniques (4ta ed.). Auburn, USA: Thomson Learning.
- Evans, R., y Black, C. (2001). Interaction between nitrogen sources and xylose affecting growth, conidiation and polyphenoloxidase. Canadian Journal of Botany, 2102-2107.
- Food and Agriculture Organization. (2002). Bread Wheat. Food and Agriculture Organization, FAO Plant Production and Protection, Roma.

- Food and Agriculture Organization. (2013). Conservación de los recursos naturales para una agricultura sostenible. Recuperado el 08 de 10 de 2015, de Agriculture and Consumer Protection Department: http://www.fao.org/ag/ca/Training_Materials/CD27-Spanish/pd/pests_diseases.pdf
- Fry, W. (2002). Principles of plant disease management. New York: Academic Press INC.
- Gao, L., y Liu, X. (2009). A novel two-stage cultivation method to optimize carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio for sporulation of biocontrol fungi. *Folia Microbiológica*, 54(2), 142-146.
- Gao, L., y Liu, X. (2010). Nutritional requirements of mycelial growth and sporulation of several biocontrol fungi on solid culture. *МИКРОБИОЛОГИЯ*, 79(5), 622-629.
- García, A. (2008). Proyecto de creación y puesta en marcha de la empresa bioinsumos de Colombia Ltda., laboratorio productor de hongos entomopatógenos y antagonistas para el manejo de plagas y enfermedades en cultivos de interés agrícola. Universidad de la Salle, Facultad de Ingeniería de Alimentos, Bogotá.
- García, M. (2007). Nematología vegetal. Universidad de Valladolid, Fitopatología, Valladolid.
- Gómez, S., Martínez, C., Carbajal, Y., y Martínez, A. (2013). Riesgo Genotóxico Por La Exposición Ocupacional A Plaguicidas En América Latina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 159-180.
- Gonzales, D., y Albert, L. (2004). General Aspects of Plaguicides. Recuperado el 24 de 09 de 2015, de <http://bvs.per.paho.org/bvsea/e/fulltext/epidemiology/024977-06.pdf>

- Gveroska, B., y Ziberoski, J. (2012). *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternata* on tobacco. *Applied Technologies y Innovations*, 7(2), 67-76.
- Hassan, T. (2015). Impact of Phytonematodes on Agriculture Economy. En T. Hassan, *Biocontrol Agents of Phytonematodes* (págs. 86-106). Boston: CABI.
- Higa, T., y Parr, J. (2001). Microorganismos Benéficos y efectivos para una agricultura y Medio Ambiente Sostenible. Recuperado el 23 de 09 de 2015, de Departamento de Agricultura de los Estados Unidos: http://www.fundases.com/userfiles/file/MicroorG_Benef_Efect.pdf
- Hilje, L. (1996). *Lecturas Sobre Manejo Integrado de Plagas*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Área Fitoprotección, Turrialba. Recuperado el 22 de 09 de 2015, de CATIE: https://books.google.com.ec/books?id=khsRAQAIAAJypg=PA1ydq=manejo+integrado+de+plagasyhl=enysa=Xyredir_esc=y#v=onepageyq=manejo%20integrado%20de%20plagasyf=false
- Inglis, P., Tigano, M., y Valadares, C. (2000). Transformation of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces lilacinus* to benomyl resistance. *Genetic Molecular Biology*, 22(1), 48-61.
- Lee, D. (2005). Life cycles. En D. Lee, *The Biology of Nematodes* (1ra ed., págs. 141-162). Londres, Inglaterra: Tylor y Francis.
- López, I. (2009). Control de *Meloidogyne* sp. en Viveros de Café (*Coffea arabica* L.). Universidad de El Salvador, 3.

- Luangsa-ard, J., Houbraeken, J., Van Doom, T., Hong, S., Borman, A., Hywel-Jones, N., y Samson, R. (2011). *Purpureocillium*, a newgenus for themedically important *Paecilomyces lilacinus*. Federation of European Microbiological Societies, 321, 141-149.
- McConnell, R., Henao, S., Nieto, O., y Rosenstock, L. (1993). Environmental epidemiology: a project for Latin America and the Caribbean. Centro Panamericano de Econología Humana y Salud, 147-201. Recuperado el 22 de 09 de 2015, de <http://bvs.per.paho.org/bvsea/e/fulltext/epidemio/024977-06.pdf>
- Monzón, A., Herrera, I., y Méndez, E. (2009). Uso y Manejo de *Paecilomyces lilacinus* para el control de nemátodos. Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía.
- Morton, O., y Mukerji, K. (2004). Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi- a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology*(6), 161-170.
- Naranjo, R. (2008). Manejo biológico de nemátodos fitoparásitos con hongos y bacterias. *Tecnología en Marcha*, 21(1), 123-132.
- Nebane, C., y Ekpo, E. (2002). Effects of culture media, temperature and light on radial growth and pycnidium production of cowpea isolate of PHOMA bakerina. *Annals of Applied Biology*, 142, 537-544.
- Nieves, C., Díaz, R., Padrón, N., y Carr, A. (Junio de 2003). Comportamiento del hongo *Paecilomyces lilacinus* en agar sabouraud dextrosa producido en Cuba. *Fitosanidad*, 7(2), págs. 49-53.

- Pedrés, B. (2004). Clonación y caracterización de una hidrofobina de clase II. (M. Casanova, y J. Martínez, Edits.) Universidad de Valencia.
- Pérez, L., y Ramírez, C. (2000). Efecto de las variables, condiciones de la fermentación y del sustrato en la producción de hongos entomopatógenos. Pontificia Universidad Javierana, 153.
- Ramírez, J. (2012). Evaluación de estrategias de control del nemátodo (*Meloydoginesp.*) en *gypsophila* (*Gypsophila paniculata*) en la finca Santa Martha Cayambe. Universidad Politécnica Salesiana, Ingeniería Agropecuaria , Quito.
- Ramírez, J., y Lacasana, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Archivos de Prevención de Riesgos Labor, 4(2), 67-75. Recuperado el 20 de 09 de 2015, de Uniciencia: <http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Placlausotoxmedexpmx.pdf>
- Ravichandra (2), N. (2008). Plant Nematology (1ra ed.). New Delhi, India: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.
- Ravichandra, N. (2014). Horticultural Nematology (1ra ed.). New Delhi, India: Springer.
- Rivera, D., Camelo, M., Estrada , G., y Obando , M. (1 de Julio de 2012). Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*. Revista Colombiana de Biotecnología, XII, 94-102. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v12n1/v12n1a10>
- Rivera, G. (2007). Conceptos introductorios a la fitopatología. San José: Universidad Estatal a Distancia.

- Rodríguez, R. (2001). Control biológico de nemátodos parasitos de plantas. *Nematrópica*, 21(1), 111-122.
- Román, J., y Acosta, N. (1991). *Nemátodos: diagnóstico y combate*. Universidad de Puerto Rico, Servicio de Extensión Agrícola, Mayaguez.
- Sivila, N., y Alvarez, S. (2013). *Producción artesanal de controladores biológicos*. Universidad Nacional de Jujuy, Facultad de Ciencias Agrarias, Jujuy.
- Solano, M., Avila, B., y Arteaga, N. (Noviembre de 2004). Hongos entomopatógenos; una esperanza en el control biológico. IX Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas, 1, pág. 16.
- Stirling, G. (2014). *Biological control of plant-parasitic nematodes*. Boston, USA: CABI.
- Sun, M., y Gao, L. (2007). Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research*, 87-92.
- Sun, M., y Liu, X. (2006). Nitrogen requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia*, 161, 295-305.
- Tigano, M., y Inglis, P. (2006). Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. *Genetic and Molecular Biology*, 29(1), 132-136.
- Triviño, C. (2003). Control biológico de nemátodos en el Ecuador. Recuperado el 14 de 10 de 2015, de INIAP: http://www.iniap.gob.ec/sitio/index.php?option=com_sobi2ycatid=2ylimitstart=90

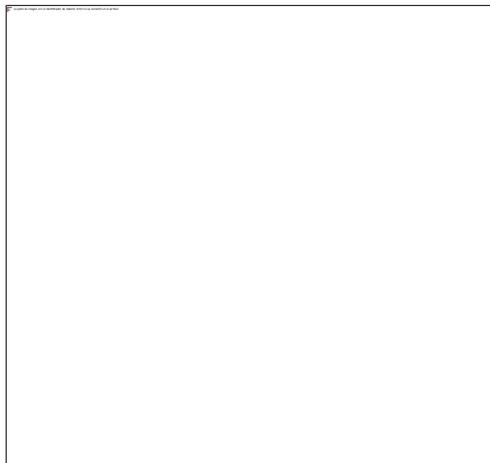
- Universidad Nacional Agraria. (2009). Producción y uso de *Paecilomyces lilacinus* para el control de nemátodos fitoparásitos. (A. Monzón, I. Herrera, y E. Méndez, Edits.)
- Vigueras, G., Shirai, K., Morales, M., y Revah, S. (2014). Crecimiento de *Paecilomyces lilacinus* con N-hexadecan y determinación de su hidrofobina plhyd. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México D.F.: SIPAL.
- Walters, D. (2009). Managing crop diseases through cultural practices. En D. Walters, Disease Control in Crops (págs. 7-10). Ames: Wiley-Blackwel.
- Wesseling, C., y Castillo, L. (2002). Plaguicidas en América Central. Eco Sal, 83-104. Recuperado el 20 de 09 de 2015, de Organizacion Mundial de la Salud: <http://www.cridlac.org/digitalizacion/pdf/spa/doc5326/doc5326-1a.pdf>

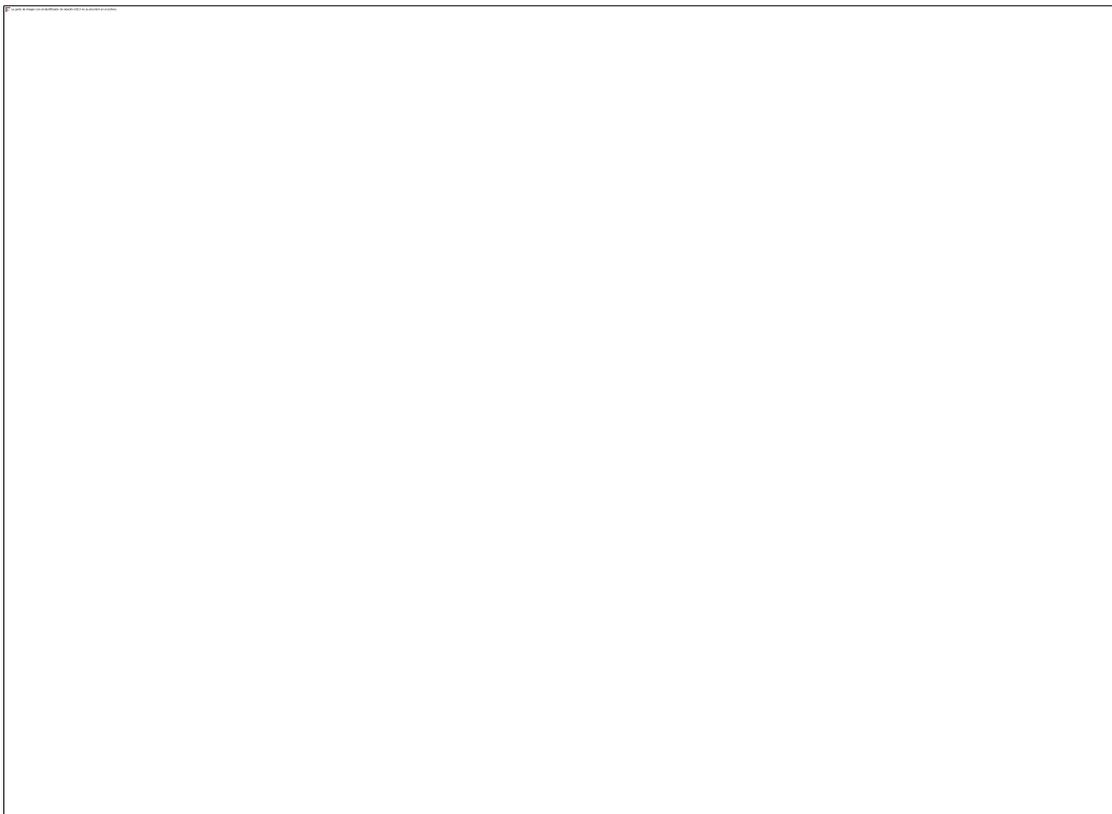
11. Anexos

Anexo 1. Cámara de Neubauer utilizada para el experimento

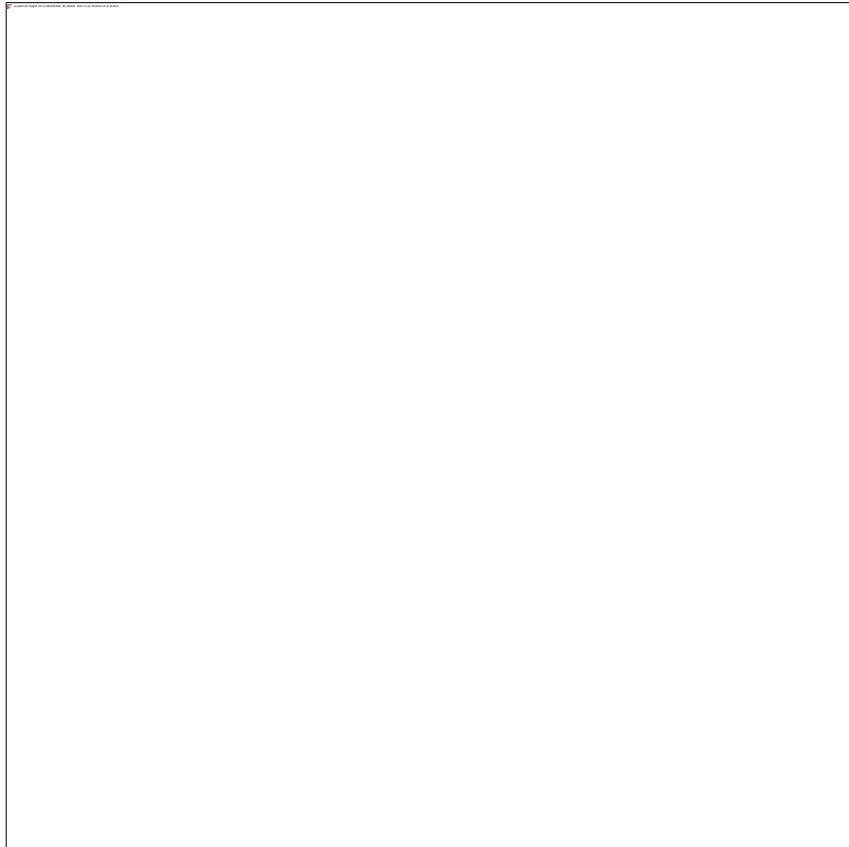


Anexo 2. Método de conteo para el uso de la cámara de Neubauer



Anexo 3. Medio de cultivo A3B3 después de 14 días de incubación**Anexo 4. Sedimentación del carbón triturado**

Anexo 5. Conteo de conidias del tratamiento A3B3 bajo microscopio (60x)



Anexo 6. Conteo de conidias (# de conidia/ 0.004 mL)

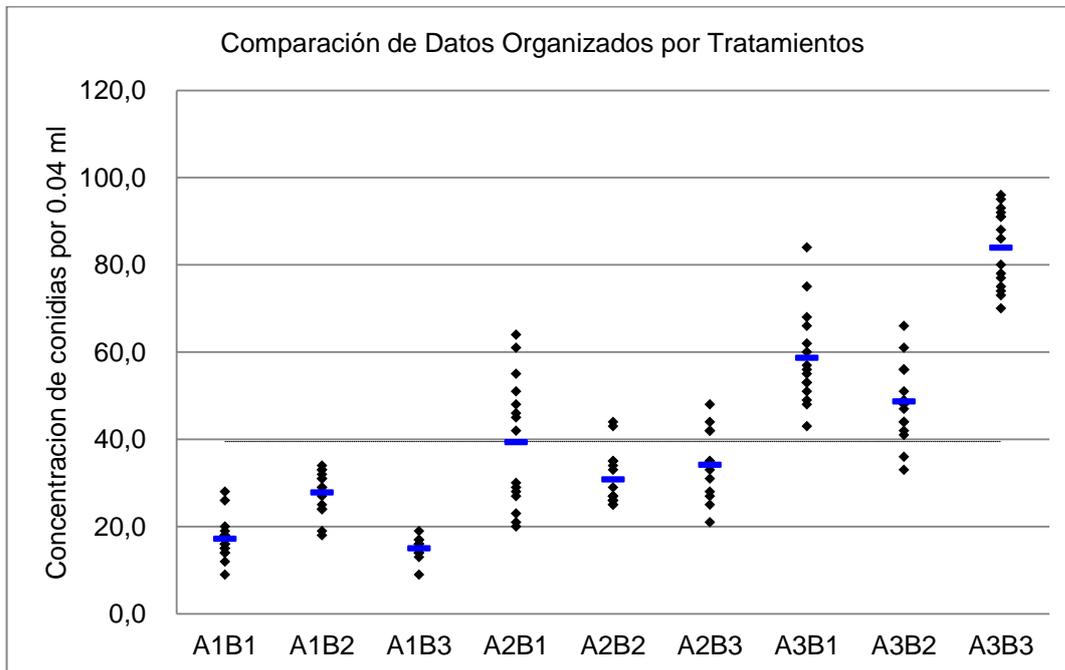
Tratamiento	Observaciones															Σ	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV		
A1B1	14	16	18	15	26	28	20	19	12	16	15	9	14	18	18	258	17.20
A1B2	29	18	31	31	25	27	29	33	19	28	24	24	33	34	32	417	27.80
A1B3	16	17	16	17	15	9	15	14	15	16	19	14	15	13	14	225	15.00
A2B1	21	29	46	42	45	48	61	55	51	64	20	28	23	27	30	590	39.33
A2B2	26	44	25	35	34	29	27	26	27	33	27	26	35	43	25	462	30.80
A2B3	34	35	42	31	27	33	34	42	44	48	21	25	28	34	35	513	34.20
A3B1	55	60	53	68	62	56	84	75	53	66	49	43	57	48	51	880	58.67
A3B2	48	44	36	42	51	56	66	41	56	61	33	56	47	44	49	730	48.67
A3B3	70	73	96	77	78	88	91	93	95	74	92	86	80	75	91	1259	83.93

Anexo 7. Datos de conteo de conidias por tratamiento (#conidias/ 0.004 mL)

		Concentración de Carbono		
		A1 (10g/L)	A2 (20 g/L)	A3 (30 g/L)
Relación C:N	B1 (20:1)	14	21	55
		16	29	60
		18	46	53
		15	42	68
		26	45	62
		28	48	56
		20	61	84
		19	55	75
		12	51	53
		16	64	66
		15	20	49
		9	28	43
		14	23	57
		18	27	48
		18	30	51
		17.20	39.33	58.67
	B2 (30:1)	29	26	48
		18	44	44
		31	25	36
		31	35	42
		25	34	51
		27	29	56
		29	27	66
		33	26	41
		19	27	56
		28	33	61
		24	27	33
		24	26	56
		33	35	47
		34	43	44
		32	25	49
		27.8	30.8	48.67
	B3 (40:1)	16	34	70
17		35	73	
16		42	96	

	17	31	77
	15	27	78
	9	33	88
	15	34	91
	14	42	93
	15	44	95
	16	48	74
	19	21	92
	14	25	86
	15	28	80
	13	34	75
	14	35	91
	15	34.2	83.93

Anexo 8. Diagrama de dispersión de datos agrupados por tratamiento



Anexo 9. Transformación de datos (concentración de conidias/g de muestra)

Repeticiones															
Tratamiento	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
A1B1	3.50E+ 08	4.00E+ 08	4.50E+ 08	3.75E+ 08	6.50E+ 08	7.00E+ 08	5.00E+ 08	4.75E+ 08	3.00E+ 08	4.00E+ 08	3.75E+ 08	2.25E+ 08	3.50E+ 08	4.50E+ 08	4.50E+ 08
A1B2	7.25E+ 08	4.50E+ 08	7.75E+ 08	7.75E+ 08	6.25E+ 08	6.75E+ 08	7.25E+ 08	8.25E+ 08	4.75E+ 08	7.00E+ 08	6.00E+ 08	6.00E+ 08	8.25E+ 08	8.50E+ 08	8.00E+ 08
A1B3	4.00E+ 08	4.25E+ 08	4.00E+ 08	4.25E+ 08	3.75E+ 08	2.25E+ 08	3.75E+ 08	3.50E+ 08	3.75E+ 08	4.00E+ 08	4.75E+ 08	3.50E+ 08	3.75E+ 08	3.25E+ 08	3.50E+ 08
A2B1	5.25E+ 08	7.25E+ 08	1.15E+ 09	1.05E+ 09	1.13E+ 09	1.20E+ 09	1.53E+ 09	1.38E+ 09	1.28E+ 09	1.60E+ 09	5.00E+ 08	7.00E+ 08	5.75E+ 08	6.75E+ 08	7.50E+ 08
A2B2	6.50E+ 08	1.10E+ 09	6.25E+ 08	8.75E+ 08	8.50E+ 08	7.25E+ 08	6.75E+ 08	6.50E+ 08	6.75E+ 08	8.25E+ 08	6.75E+ 08	6.50E+ 08	8.75E+ 08	1.08E+ 09	6.25E+ 08
A2B3	8.50E+ 08	8.75E+ 08	1.05E+ 09	7.75E+ 08	6.75E+ 08	8.25E+ 08	8.50E+ 08	1.05E+ 09	1.10E+ 09	1.20E+ 09	5.25E+ 08	6.25E+ 08	7.00E+ 08	8.50E+ 08	8.75E+ 08
A3B1	1.38E+ 09	1.50E+ 09	1.33E+ 09	1.70E+ 09	1.55E+ 09	1.40E+ 09	2.10E+ 09	1.88E+ 09	1.33E+ 09	1.65E+ 09	1.23E+ 09	1.08E+ 09	1.43E+ 09	1.20E+ 09	1.28E+ 09
A3B2	1.20E+ 09	1.10E+ 09	9.00E+ 08	1.05E+ 09	1.28E+ 09	1.40E+ 09	1.65E+ 09	1.03E+ 09	1.40E+ 09	1.53E+ 09	8.25E+ 08	1.40E+ 09	1.18E+ 09	1.10E+ 09	1.23E+ 09
A3B3	1.75E+ 09	1.83E+ 09	2.40E+ 09	1.93E+ 09	1.95E+ 09	2.20E+ 09	2.28E+ 09	2.33E+ 09	2.38E+ 09	1.85E+ 09	2.30E+ 09	2.15E+ 09	2.00E+ 09	1.88E+ 09	2.28E+ 09

Anexo 10. Componente del ANOVA

Formula	Valor
$FC = \frac{\sum \Sigma^2}{TxR}$	1.3172E+20
$SC\ Tot = \sum(x^2) - FC$	4.10E+19
$SC\ Trat = \frac{\sum \Sigma xi^2}{t}$	3.5287E+19
$SC (A) =$	2.78685E+19
$SC (B) =$	1.09753E+18
$SC (AB) =$	6.32094E+18
$SC (EE) =$	5.69E+18

Anexo 11. Tabla de comparación de medias por el método de Tukey

Tratamiento		A1B3	A1B1	A1B2	A2B2	A2B3	A2B1	A3B2	A3B1	A3B3
	Media	3.75E+08	4.30E+08	6.95E+08	7.70E+08	8.55E+08	9.83E+08	1.22E+09	1.47E+09	2.10E+09
A1B3	3.75E+08		5.50E+07	3.20E+08	3.95E+08	4.80E+08	6.08E+08	8.42E+08	1.09E+09	1.72E+09
A1B1	4.30E+08			2.65E+08	3.40E+08	4.25E+08	5.53E+08	7.87E+08	1.04E+09	1.67E+09
A1B2	6.95E+08				7.50E+07	1.60E+08	2.88E+08	5.22E+08	7.72E+08	1.40E+09
A2B2	7.70E+08					8.50E+07	2.13E+08	4.47E+08	6.97E+08	1.33E+09
A2B3	8.55E+08						1.28E+08	3.62E+08	6.12E+08	1.24E+09
A2B1	9.83E+08							2.33E+08	4.83E+08	1.12E+09
A3B2	1.22E+09								2.50E+08	8.82E+08
A3B1	1.47E+09									6.32E+08
A3B3	2.10E+09									

Valor Crítico = 2.41E+08

Anexo 12. Hoja de Vida

Juan Carlos Samaniego Branstetter

Ingeniero de Agroempresa
 Urbanización El Condado, calle F lote 316, Quito-Ecuador
 Telfs. (593) 2498674 cel: 0984489134 juanca1990@hotmail.com

EXPERIENCIA PROFESIONAL EN EL ÁREA AGROEMPRESA

Junio 2010-presente: Florisam

Cargo: Asesor de Ventas de rosas, claveles y flores de verano.

Función: Recepción de pedidos de clientes y coordinación de abastecimiento de 20 fincas, y elaboración y emisión de facturas.

2014- Presente: Unique Farms

Cargo: Agente de Ventas de flores y productos alimenticios.

Función: Contactar clientes potenciales y conseguir proveedores que cumplan con las especificaciones necesitadas.

Agosto 2015 - Presente: Take a Bloom

Cargo: Fundador de compañía.

Función: Importador, productor y vendedor de tulipanes.

Junio 2010-Septiembre 2015: Granja Experimental Universidad San Francisco

Cargo: Voluntario en trabajo de campo.

Función: Ayuda en planificación de tierras, siembra, cosecha y manejo de cultivos.

Junio 2009 – Junio 2010 : Florisam (EEUU)

Cargo: Administrador de Operaciones

Función: Coordinación de pedidos, embarques, logística y cobros de operación relacionadas a la floricultura establecida en California.

FORMACIÓN ACADÉMICA

2009-2015 Ingeniería de Agroempresa

Universidad San Francisco de Quito (Ecuador)

Honores: Acreedor de Beca Columbela

2012-2013 Programa de Intercambio
Michigan State University

1998-2009 Bachillerato Nacional

Unidad Educativa Tomas Moro (Ecuador)

CURSOS Y TALLERES REALIZADOS

- 2015 Segundo Simposio de Fitopatología, Control Biológico e Interacciones Planta-Patógeno, Quito, 24 Septiembre-25 de Septiembre 2015, 20 horas.
- 2013 Manejo de Agua y Fertirrigación, Quito, 7, 14, 21, y 28 de Septiembre 2013, 40 horas.
- 2012 Primer Simposio en Fisiología Vegetal, 24 febrero-25 Febrero, 20 horas.

OTRAS DESTREZAS

Idiomas : **Español:** Nativo
Inglés: Nativo (Madre Americana)

Informática:

Excel. Nivel Alto
Presentaciones Power Point: Nivel Alto
Word: Nivel Alto
Internet: Nivel Alto

- **Otros:** Me considero una persona amable, creativa, constante y responsable, organizada, dedicada e innovadora. Tengo un buen manejo del tiempo, habilidades organizacionales y sociales. Estoy dispuesto a adaptarme a cualquier circunstancia y emprender e incursionar en cualquier área.