

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Aislamiento y Purificación de Metabolitos de *Bacillus licheniformis* y *Trichoderma harzianum* con Potencial Nematicida

Por:

MELQUISEDEC PASCUAL DOMÍNGUEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para

obtener el título de:

INGENIERO AGRONOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México
Febrero del 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Aislamiento y Purificación de Metabolitos de *Bacillus licheniformis* y *Trichoderma harzianum* con Potencial Nematicida

Por:

MELQUISEDEC PASCUAL DOMÍNGUEZ


Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada


M.P. María Alejandra Torres Tapia
Asesor Principal


M.C. Leticia Escobedo Bocado
Coasesor


Q.F.B. José Humberto Sánchez Robles
Coasesor


Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.

Febrero, 2013



La presente tesis fue financiada por el proyecto “**Desarrollo de un producto bionematicida agrícola y determinación de su efectividad, para el control del nemátodo agallador *Meloidogyne spp.* que impacta a cultivos de interés comercial en México**” con clave ECONOMÍA-2011-01-164858 del Fondo de Innovación Tecnológica.

DEDICATORIA

Dedico éste trabajo a mis padres Merlín Pascual Mateo y Roció Domínguez Millán, porque nunca escatimaron en esfuerzos. Por el apoyo y ejemplo que en cada segundo de mi vida me han brindado.

Por sus cuidados, amor y comprensión. Por sus sabios consejos que me orientaron por el camino recto de la vida, pero principalmente por ayudarme a terminar mi carrera profesional que representa para mí la mejor de las herencias.

A mis hermanas Onoresbeinaydi Pascual, Yazmín Pascual, pues ellos son los pilares de mi vida y me han brindado la virtud necesaria para alcanzar cada logro y soportar cada derrota. Su esfuerzo incesante ha moldeado cada uno de mis pensamientos y su amor desinteresado ha otorgado a mis actos una razón.

AGRADECIMIENTOS

Dios te doy gracias por haberme permitido llegar felizmente a este día y te pido que con tu luz me guíes y me acompañes siempre a lo largo de mi vida profesional.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por acogerme durante cuatro años y medio así como brindarme todo el conocimiento necesario para ser una persona de bien y poder contribuir con un grano de arena para el desarrollo del campo mexicano.

A mis asesores Q.F.B. José Humberto Sánchez Robles, M.C. Alejandra Torres Tapia y M.C. Leticia Escobedo Bocardo por su apoyo y paciencia en la realización de éste trabajo de investigación.

Al personal de Biorganix Mexicana S. A. de C.V.; M.C. Rebeca Cacique Valdez, M.C. Argentina Orta, quienes con su paciencia e ideas me ayudaron grandemente en la elaboración de éste trabajo de investigación, a Esmeralda que con sus opiniones colaboró en éste trabajo, como también a Cecilia, Patricia, Juanita, Gabriela, Abel y Martha, a quienes les agradezco profundamente su amistad brindada durante mi estancia en el centro de investigación como practicante.

A mis amigos; Lourdes V, Lourdes M, Marisol, Mirsa Araceli, Eduardo, Javier, Homero, Yerry, Carol, Rosibel, Leodan, Jorge, Brenda, Karen y Matilde Jimena, quienes me animaron para seguir adelante y no rendirme, agradezco esos grandes momentos de locura compartidos haciéndome olvidar del estrés académico.

Por el apoyo y motivación del Ing. Daniel, quien me hizo ver que con constancia se pueden lograr las cosas.

Al centro de investigación Biorganix Mexicana S. A. de C.V., por la contribución en la realización de este trabajo de investigación y que gracias a este centro aprendí el uso de equipo de laboratorio y sus aplicaciones biotecnológicas.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general.....	2
1.2 Objetivos específicos.....	2
1.3 Hipótesis	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Generalidades de los nemátodos	3
2.2 Clasificación taxonómica.....	4
2.3 Clasificación de los nemátodos de acuerdo a su biología	7
2.4 Principales nemátodos de importancia agrícola.....	8
2.5 Distribución a nivel mundial	10
2.6 Distribución a nivel nacional.....	10
2.7 Pérdidas económicas ocasionadas por nemátodos	11
2.8 Características del nemátodo agallador <i>Meloidogyne</i> spp.....	12
2.8.1 Biología	12
2.8.2 Características morfológicas	12
2.8.3 Ciclo de vida.....	13
2.8.4 Síntomas.....	15
2.9 Como afecta el nemátodo a la planta	15
2.10 Interrelación entre los nemátodos y otros fitopatógenos.....	17
2.11 Métodos de control	18

2.11.1 Legal.....	18
2.11.2 Cultural	19
2.11.3 Físico	20
2.11.4 Químico.....	20
2.11.5 Biológico.....	21
2.11.6 Control integrado o manejo de los nemátodos	22
2.12 Enzimas.....	23
2.12.1 Clasificación de las enzimas.....	23
2.12.2 Generalidades sobre las proteasas	24
2.12.3 Clasificación.....	25
2.12.4 Aplicación agrícola de las enzimas.....	26
2.13 Importancia agrícola	27
2.14. Microorganismos productores de proteasas	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 Ubicación del experimento.....	29
3.2 Metodología	29
3.2.1 Selección de cepas productoras de proteasas mediante ensayos en placa.	29
3.2.2 Evaluación de la producción de proteasas a escala de laboratorio.....	30
3.2.3 Evaluación de la efectividad biológica <i>in vitro</i> de los extractos de fermentación como nematocida.....	33
3.2.4 Purificación de proteínas mediante FPLC.	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1 Selección de cepas productoras de proteasas mediante ensayos en placa..	36
4.2 Evaluación de la producción de proteasas a escala de laboratorio	39
4.2.1 Cinética para la cepa BSM.....	39

4.2.2 Cinéticas para la cepa TH9	41
4.3 Evaluación de la efectividad biológica in vitro de los extractos de fermentación como nematocida.....	44
4.4 Purificación de proteasas mediante FPLC utilizando una columna de sephadex G-25.....	46
5. CONCLUSIONES	54
5.1 PERSPECTIVAS	55
6. LITERATURA CITADA	56

ÍNDICE DE CUADROS

No. de Cuadro	Descripción	Página
2.1	Resumen de los principales nemátodos fitopatógenos de importancia agrícola	9
2.2	Clasificación internacional de las enzimas (Lehninger, 1993).....	24
2.3	Empresas generadoras de productos biológicos en base a microorganismos.....	26
3.1	Nomenclaturas utilizadas en la metodología experimental.....	30
3.2	Identificación de tratamientos y concentraciones en la aplicación de metabolitos o medio de cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Bacillus licheniformis</i>	34
4.1	Cuadros medios y significancia en variable de mortandad de nemátodos con la aplicación de tratamientos y concentraciones de metabolitos a base de TH9 y BSM.....	44
4.2	Comparación de medias variable de mortandad de nemátodos con la aplicación de tratamientos de metabolitos a base de TH9 y BSM.....	45
4.3	Comparación de medias variable de mortandad de nemátodos con la aplicación de concentraciones de metabolitos a base de TH9 y BSM.....	45
4.4	Comparación múltiple de medias analizando la interacción tratamiento y concentración.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

No. de Figura	Descripción	Página
2.1	Biología y tamaño relativo de los nemátodos fitoparásitos más importantes (Agrios, 2005).....	7
2.2	Distribución de especies y razas de <i>Meloidogyne</i> spp., en México (cid del prado, 2001).....	11
2.3	Corte transversal de una agalla en raíz de tomate infectada por <i>Meloidogyne</i> spp.....	16
2.4	Mecanismo de invasión de <i>Meloidogyne</i> spp., a la raíz de la planta (Jung et al., 1998).....	17
3.1	Curva patrón de azúcares totales por el método de Dubois.....	31
3.2	Curva patrón de proteínas por el método de Bradford.....	32
4.1	Cinética del índice de potencia respecto al tiempo en la cepa del género <i>Bacillus licheniformis</i> denominada BSM.....	36
4.2	Cinética del índice de potencia respecto al tiempo en la cepa del género <i>Bacillus licheniformis</i> denominada BSJ.....	37
4.3	Cinética del índice de potencia respecto al tiempo en la cepa del género <i>Trichoderma harzianum</i> denominada TH9.....	38
4.4	Cinética del índice de potencia respecto al tiempo en la cepa del género <i>Trichoderma harzianum</i> denominada TH.....	38
4.5	Producción de biomasa de la cepa <i>Bacillus licheniformis</i> (BSM) en medio de proteína de suero (PS) determinada mediante absorbancia a 560 nm.....	39
4.6	Concentración de proteínas de la cepa <i>Bacillus licheniformis</i> denominada (BSM), en medio de proteína de suero determinada mediante el método de Bradford.....	40
4.7	Concentración de azúcares totales en la producción de proteasas de la cepa <i>Bacillus licheniformis</i> denomina (BSM) determinada mediante el método de fenol-sulfúrico.....	41

4.8	Producción de biomasa de la cepa <i>Trichoderma harzianum</i> denominada (TH9) en medio de proteína de suero determinada mediante el método de peso seco.....	42
4.9	Concentración de proteínas de la cepa <i>Trichoderma harzianum</i> denominada (TH9) en la producción de proteasas en medio de proteína de suero determinada mediante el método de Bradford	43
4.10	Concentración de azúcares totales en la producción de proteasas de la cepa <i>Trichoderma harzianum</i> (TH9) determinada mediante el método de fenol-sulfúrico.....	43
4.11	Concentración de proteínas de la cepa <i>Trichoderma harzianum</i> (TH9) en medio PS (proteína de suero) en cada una de las fracciones.....	47
4.12	Actividad enzimática de la cepa <i>Trichoderma harzianum</i> (TH9) en medio PS (proteína de suero) en cada una de las fracciones.....	48
4.13	Concentración de proteínas de la cepa <i>Bacillus licheniformis</i> (BSM) en medio PS (proteína de suero) en cada una de las fracciones.....	49
4.14	Actividad enzimática de la cepa <i>Bacillus licheniformis</i> (BSM) en medio PS (proteína de suero) en cada una de las fracciones.....	49
4.15	Concentración de proteínas de la cepa <i>Trichoderma harzianum</i> (TH9) en un medio de TH (medio para hongos) en cada una de las fracciones.....	50
4.16	Actividad enzimática de la cepa <i>Trichoderma harzianum</i> (TH9) en un medio de TH (medio para hongos) en cada una de las fracciones.....	51
4.17	Concentración de proteínas de la cepa <i>Bacillus licheniformis</i> (BSM) en medio T8 (medio para bacterias) en cada una de las fracciones.....	52
4.18	Actividad enzimática de la cepa <i>Bacillus licheniformis</i> (BSM) en medio T8 (medio para bacterias) en cada una de las fracciones.....	52

RESUMEN

Los nemátodos fitopatógenos son parásitos obligados; esto significa que requieren de un hospedante susceptible con raíces sanas para que puedan llevar a cabo las funciones de alimentación, reproducción y crecimiento. La población de nemátodos decrece cuando el sistema radical de la planta huésped es destruido o está en mala condición. *Meloidogyne* spp es una de las especies de nemátodos económicamente más importantes por el grado de daño que causan a los cultivos por lo que se busca una forma de control biológico alterna al control químico. *Trichoderma harzianum* y *Bacillus licheniformis* son microorganismos con capacidad de secretar a partir de su metabolismo proteínas proteasas, las cuales tienen capacidad de degradar la cutícula de los nematodos.

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue aislar y purificar metabolitos de *Bacillus licheniformis* y *Trichoderma harzianum* con potencial nematocida, utilizando como criterios de selección el índice de potencia (relación que existe entre el diámetro del halo de la hidrólisis y el diámetro de la colonia, Dh/Dc).

En la producción de proteínas de BSM (*Bacillus licheniformis*. Michoacán), la máxima producción de proteínas se obtuvo a las 120 h con un valor de 1100 mg/L y una actividad enzimática de 7 UT/mL (unidades de tirosina por mililitro) a los 10 minutos. La cepa TH9 (*Trichoderma harzianum*. 9) alcanzó su máxima producción de proteínas a las 48 h con un valor de 82 mg/L y una actividad enzimática de 63.1 UT/ml (unidades de tirosina por mililitro) a los 10 minutos.

Se observó que los mejores tratamientos fueron el 1 (Metabolitos *Trichoderma harzianum* (TH9)) y 2 (Metabolitos *Bacillus licheniformis* (BSM)) a una concentración de 5%, donde *B. licheniformis* (BSM) indujo mortalidad del 100% y *T. harzianum* (TH9) al 93%. Se concluye que estas dos cepas evaluadas tienen alto potencial nematocida, y se pueden aplicar ampliamente en la agricultura.

Palabras clave: Aislamiento, Purificación de compuestos, Nemátodos fitopatógenos, Control biológico, Proteasas.

1. INTRODUCCIÓN

Los nemátodos fitoparásitos son considerados enemigos invisibles del agricultor y, a nivel mundial, están descritos como causantes de elevadas pérdidas en los cultivos (Rojas, 2003). Aunado al daño directo que estos organismos ocasionan, muchas veces dejan puertas de acceso para el establecimiento de hongos, bacterias y virus con lo cual, estas cifras pueden alcanzar pérdidas aún mayores.

Entre los nemátodos fitoparásitos, los formadores de agallas pertenecientes al género *Meloidogyne* spp., son considerados los de mayor importancia económica a nivel mundial debido al gran número de especies de plantas que atacan, que incluye la mayoría de los vegetales, frutales, ornamentales y ocasionan una reducción notable en los rendimientos de los cultivos (Trudgill *et al.*, 2001).

Hoy en día se tiene claro el daño potencial que los nemátodos representan para la agricultura en general, sin embargo, todavía existen dificultades con relación a su control. Tradicionalmente se han usado diferentes alternativas de control dirigidas a reducir y/o eliminar las poblaciones de nemátodos (Berkelaar, 2002). Durante muchos años, se han empleado de manera irracional una amplia gama de nematicidas químicos, muchos de los cuales son biocidas de organismos benéficos presentes en el suelo. Así mismo, el impacto nocivo que estos causan a la salud humana y el ambiente en general, han limitado su uso a nivel mundial (Labrada *et al.*, 2001; Braga *et al.*, 2003).

El método de control nematológico más efectivo es el químico; sin embargo, la mayoría de los productos químicos utilizados como nematicidas, ya sean fumigantes o no fumigantes (granulares y emulsiones) presentan riesgos al medio ambiente, por lo que su uso debe ser limitado siempre que existan alternativas.

Debido a esta problemática, se buscan otras opciones que disminuyan los efectos adversos que los nematicidas químicos ocasionan al ambiente. Por ello, se evaluó en el presente trabajo, los metabolitos tanto de hongos como de bacterias como alternativa de control biológico del nemátodo agallador *Meloidogyne* spp., por lo que planteo el siguiente:

1.1 Objetivo general

Aislar y purificar metabolitos de *Bacillus licheniformis* y *Trichoderma harzianum* con potencial nematicida.

1.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar compuestos de cepas microbianas de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus licheniformis* con actividad nematicida.
- Purificar enzimas proteasas a partir de caldos de fermentación de *T. harzianum* y *B. licheniformis*.
- Evaluar la actividad nematicida de enzimas proteasas purificadas.

1.3 Hipótesis

Al menos uno de los metabolitos aislados e identificados en los extractos microbianos de *Bacillus licheniformis* y *Trichoderma harzianum* tendrá actividad nematicida.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de los nemátodos

Los primeros nemátodos fitoparásitos fueron reportados por Needham, (1743) al encontrarlos en el interior de las agallas del trigo (granos), sin embargo, no fue sino hasta 1850 cuando se observaron otros nemátodos entre los del bulbo y del tallo, los noduladores y formadores de quistes en las raíces (Agrios, 2005)

Todos los nemátodos comparten algunas características comunes: no son segmentados, tienen simetría bilateral (Gonzales, 1989), son triploblásticos, pseudocelomados y vermiformes, aunque algunas especies se tornan redondeadas en sus últimas fases. Tienen una cutícula exterior que es secretada internamente desde la hipodermis. Los músculos se unen longitudinalmente a la hipodermis del nemátodo, permitiéndole moverse en dirección dorso ventral. Dentro de los nemátodos hay un tubo interno, el canal alimenticio, desde la región cefálica hasta la cola. En la parte media posterior de los nemátodos están los órganos reproductivos. Casi todas las especies poseen sexos separados y por lo general, los machos son más pequeños que las hembras. No tienen sistemas circulatorio ni respiratorio definidos; dependen de la pared de su cuerpo para la difusión del agua, gases y metabolitos (Decraemer *et al.*, 2006).

Los nemátodos fitopatógenos son parásitos obligados (Jacas *et al.*, 2005). Esto significa que requieren de un hospedante susceptible con raíces sanas para que puedan llevar a cabo las funciones de alimentación, reproducción y crecimiento. La población decrece cuando el sistema radical de la planta huésped es destruido o está en mala condición (Rivera, 1999). Con frecuencia causan daños tan serios, que es

imposible mantener una agricultura económicamente viable, sin el uso de alguna forma de control nematológico (Talavera, 2003).

Existen nemátodos bacterívoros, fungívoros, depredadores de otros nemátodos, parásitos de insectos y herbívoros o parásitos de plantas. Estos últimos causan importantes daños en los cultivos. Debido a su pequeño tamaño y a que viven en el suelo, no pueden verse a simple vista y su estudio eficaz sólo ha sido posible cuando la disponibilidad de microscopios de alta resolución y la puesta a punto de técnicas para extraerlos del suelo, permitió estudios cuantitativos sobre sus densidades de población y correlaciones con los daños producidos en los cultivos (Talavera, 2003).

Los nemátodos parásitos de las plantas se distinguen del resto porque presentan una estructura parecida a una aguja hipodérmica llamada estilete, la cual usan para perforar las células, tomar alimentos y secretar proteínas y metabolitos que le facilitan el proceso de parasitismo. Además, tienen un sofisticado sistema nervioso y órganos sensoriales que les permiten encontrar la planta hospedante, localizar células específicas, aparearse y reproducirse (Decraemer *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2005).

2.2 Clasificación taxonómica

Todos los nemátodos fitoparásitos pertenecen al phylum Nematoda. La mayoría de los géneros de nemátodos parásitos importantes pertenecen al orden Tylenchida, pero algunos pertenecen al orden Dorylaimida, por lo que a continuación se presenta la clasificación taxonómica de las dos órdenes con sus respectivas familias y géneros. En la Figura 2.1 se observan claramente las características distintivas entre diferentes géneros de nemátodos fitoparásitos.

Phylum: Nematoda

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Tylenchidae

Géneros: a) *Anguina*, nemátodo del trigo o formador de la agalla de la semilla.

b) *Ditylenchus*, nemátodo del tallo o bulbo de la alfalfa, cebolla narciso, etc.

Familia: Tylenchorhynchidae

Género: a) *Tylenchorhynchus*, nemátodo causante del achaparramiento del tabaco, maíz, algodón, etc.

Familia: Pratylenchidae

Géneros: a) *Pratylenchus*, nemátodo lesionado de los árboles y de casi todas las plantas de cultivo.

b) *Radopholus*, nemátodo barrenador del plátano, cítricos cafeto, caña de azúcar, etc.

Familia: Hoplolaimidae

Géneros: a) *Hoplolaimus*, nemátodo lanza del maíz, caña de azúcar, algodón, alfalfa, etc.

b) *Rotylenchus*, nemátodo espiral de varias plantas.

c) *Helicotylenchus*, nemátodo espiral de varias plantas.

Familia: Belonolaimidae

Género: a) *Belonolaimus*, nemátodo picador de los cereales, leguminosas, cucurbitáceas, etc.

Superfamilia: Heteroideroidea

Familia: Heteroderidae

Géneros: a) *Globodera*, nemátodo formador de quistes de la papa.

b) *Heterodera*, nemátodo formador de quistes del tabaco, soya, remolacha azucarera, cereales, etc.

c) *Meloidogyne*, nemátodo formador de agallas de la raíz de casi todas las plantas de cultivo.

Familia: Nacobbidae

Géneros: a) *Nacobbus*, nemátodo del nódulo falso de la raíz.

b) *Rotylenchulus*, nemátodo reniforme del algodón, papaya, té, tomate, etc.

Superfamilia: Criconematoidea

Familia: Criconematidae

Géneros: a) *Criconemella*, nemátodo anular de las plantas leñosas.

b) *Hemicycliophora*, nemátodo de la vaina de varias plantas.

Familia: Paratylenchidae

Género: a) *Paratylenchus*, nemátodo alfiler de varias plantas.

Familia: Tylenchulidae

Género: a) *Tylenchulus*, nemátodo de los cítricos, vid, olivo, lila, etc.

Suborden: Aphelenchina

Superfamilia: Aphelenchoidea

Familia: Aphelenchoididae

Géneros: a) *Aphelenchoides*, nemátodo foliar del crisantemo, fresa, begonia, arroz, etc.

b) *Bursaphelenchus*, nemátodo de la madera del pino.

c) *Rhadinaphelenchus*, nemátodo del anillo rojo del cocotero.

Orden: Dorylaimida

Familia: Longidoridae

Géneros: a) *Longidorus*, nemátodo acicular de algunas plantas.

b) *Xiphinema*, nemátodo daga de árboles, enredaderas leñosas y de muchas plantas anuales.

Familia: Trichodoridae

Géneros: a) *Paratrichodorus*, nemátodo formador de la raíz achatada de los cereales, hortalizas, manzano, etc.

b) *Trichodorus*, nemátodo formador de la raíz achatado de la remolacha azucarera, papa, cereales, etc. (Agrios, 2005).

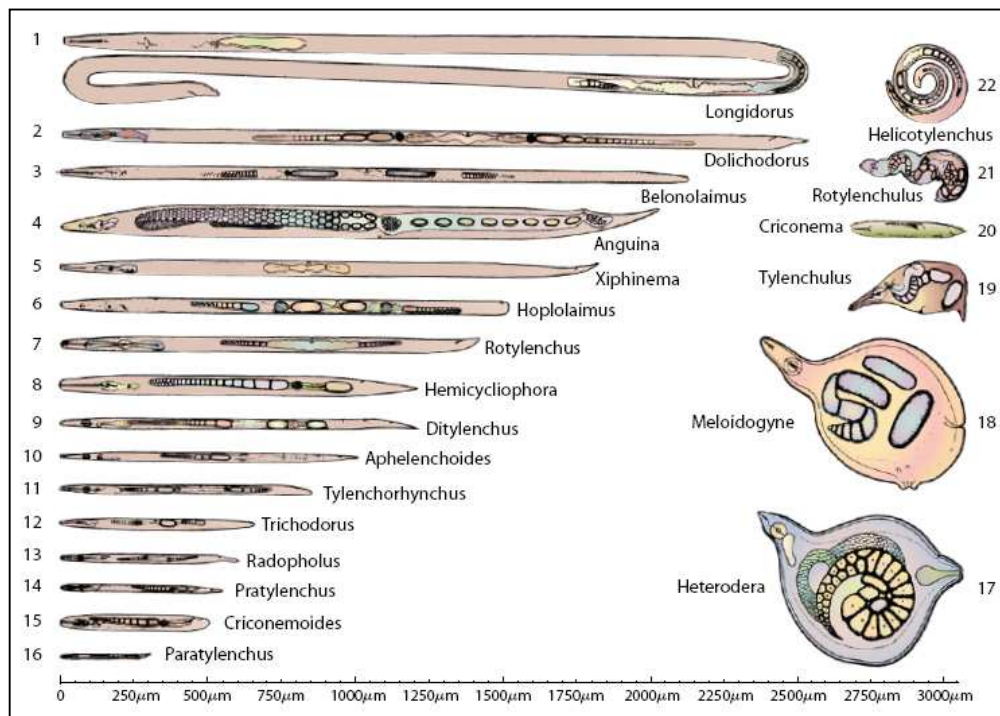


Figura 2.1 Biología y tamaño relativo de los nemátodos fitoparásitos más importantes (Agrios, 2005).

2.3 Clasificación de los nemátodos de acuerdo a su biología

Generalmente, se puede distinguir tres tipos de nemátodos parásitos de las raíces, basándose en su biología (Rivera, 1999):

1. Los nemátodos ectoparásitos permanecen fuera de la planta. Para alimentarse, perforan las capas celulares externas de la planta con su estilete (Carlier, 2002). No penetran al interior de los tejidos de la planta, teniendo la capacidad de moverse hacia nuevos sitios de alimentación. En general los nemátodos ectoparásitos tienen estiletes largos y la profundidad a la que pueden alimentarse depende de la longitud del estilete (Rivera, 1999), no suelen causar problemas graves, pero pueden tener una función importante al interactuar con otros microorganismos patógenos (Bello, 2003).

2. Los nemátodos semi-endoparásitos se caracterizan por que solo introducen la parte anterior de su cuerpo en la raíz, mientras que la sección posterior se mantiene en el suelo (ejemplos *Rotylenchulus* sp y *Tylenchulus* sp), (Rivera, 1999).
3. Los nemátodos endoparásitos penetran totalmente la raíz, se alimentan crecen, maduran y depositan los huevos dentro de la raíz o unidas a está. Los endoparásitos incluyen nemátodos vermiformes que tienen la región labial plana y un estilete fuerte que les permite romper la membrana celular, penetrar en las células y moverse a través de los tejidos corticales de la raíz. Las plantas afectadas muestran síntomas de clorosis y falta de vigor, apareciendo en las raíces necrosis y heridas (Bello, 2003). Estos nemátodos se dividen en dos grupos: **endoparásitos migratorios** y **endoparásitos sedentarios** (Rivera, 1999):
 - A. Los endoparásitos migratorios invaden los tejidos de las plantas, permanecen migratorios (móviles) y se alimentan de las numerosas células normales dentro de la planta. Ponen huevos individualmente, dentro o fuera de la planta (Carlier, 2002).
 - B. Mientras que los endoparásitos sedentarios tienen un sitio fijo de alimentación, pierden la movilidad y adquieren una forma globosa (ejemplos; *Meloidogyne* spp., y *Heterodera* spp.), (Rivera, 1999).

2.4 Principales nemátodos de importancia agrícola

Se conocen poco mas de 100 géneros de nemátodos fitoparásitos, todos distribuidos en dos órdenes, *Tylenchida* y *Dorilaymida* (Arauz, 1998).

1. Los nemátodos del orden *Tylenchida* poseen un lóbulo basal o nudo en la base del estilete; poseen la faringe dividida en cuatro partes, procorpus, metacorpus o

bulbo medio y un bulbo posterior; y la cutícula posee anillos conspicuos (Arauz, 1998).

2. En *Dorilaymida* el lóbulo basal del estilete y el bulbo medio están ausentes, y los anillos no son discernibles por microscopia de luz. Basta decir que la diferencia entre las familias se basa en características morfológicas como la estructura de la región cefálica, la fusión del procorpus con el metacorpus, la presencia de uno o dos ovarios, el tipo de traslape entre el esófago y el intestino, la morfología del estilete, la forma de la hembra, la profundidad de los anillos cuticulares y la presencia del ducto de la glándula esofágica dorsal en el procorpus (Arauz, 1998).

Arauz (1998) y Talavera (2003) coinciden en la descripción de algunos de los géneros de nemátodos, en cuanto a los síntomas que provocan en algunos cultivos de importancia agrícola (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Resumen de los principales nemátodos fitopatógenos de importancia agrícola.

Géneros	Síntomas	Cultivos
<i>Meloidogyne</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agallas en raíces ▪ Debilitamiento general de la planta 	Hortícolas, cereales, frutales, ornamentales
<i>Pratylenchus</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lesiones y destrucción de raíces ▪ Debilitamiento general de la planta 	Hortícolas, cereales, frutales, ornamentales
<i>Globodera</i> spp. <i>Heterodera</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cuentas de collar en raíces ▪ Debilitamiento general de la planta 	Patata, tabaco, remolacha, leguminosas.
<i>Ditylenchus</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Distorsiones en hojas y bulbos ▪ Decoloración de los bulbos 	Cebolla, ajo, bulbos, cereales
<i>Tylenchulus</i> spp. <i>Semipenetrans</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Deterioro radicular. ▪ Debilitamiento de la planta 	Cítricos y viña
<i>Xiphinemas</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Engrosamientos y necrosis radicular 	Cultivos perennes

Fuente:(Arauz ,1998; Talavera, 2003).

2.5 Distribución a nivel mundial

El nemátodo del nódulo de la raíz *Meloidogyne* spp., está extensamente distribuido por el mundo y son favorecidos por suelos con temperatura alta (Hidalgo *et al.*, 1990).

Los nemátodos agalladores de raíces (*Meloidogyne* spp.) son unas de las plagas más importante de cultivos agrícolas a nivel mundial, son endoparásitos obligados con un rango de hospedantes que abarca más de 3000 especies de plantas (Pino, 2010).

Dentro del género *Meloidogyne* han sido descritas más de ochenta especies (Subbotin, 2006), de las cuales diez son importantes organismos causantes de plagas y cuatro de ellas se encuentran distribuidas en áreas agrícolas de todo el mundo, por lo que se consideran las principales especies de este género (Sirca *et al.*, 2004). Estas especies son: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*. Las dos primeras son más comunes en climas tropicales, *M. arenaria* es frecuente en climas subtropicales y *M. hapla* en regiones templadas, aunque también puede encontrarse en las zonas altas de las regiones tropicales (Díaz, 2000).

El género *Meloidogyne* tiene una amplia gama de hospedantes que se extiende a más de 2000 especies de plantas (Castagnone, 2002). Entre las especies del género, *M. incognita* es la de mayor incidencia a nivel mundial y afecta cultivos de importancia económica como caña de azúcar, café, tabaco, algodón (*Gossypium* spp.), arroz (*Oryza sativa* L.), maíz (*Zea mays* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.) y plátano (*Musa* spp.), entre otros (Lamberti, 2005).

2.6 Distribución a nivel nacional

El nemátodo agallador *Meloidogyne* spp., está presente en varias zonas agrícolas de México, atacando un gran número de especies cultivadas (Cid del Prado *et al.*, 2001).

En México, el nemátodo agallador de raíces se ha reportado en Aguascalientes, Chiapas, Durango, Edo. de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas; como se muestra en la Figura 2.2 (Cid del Prado *et al.*, 2001).

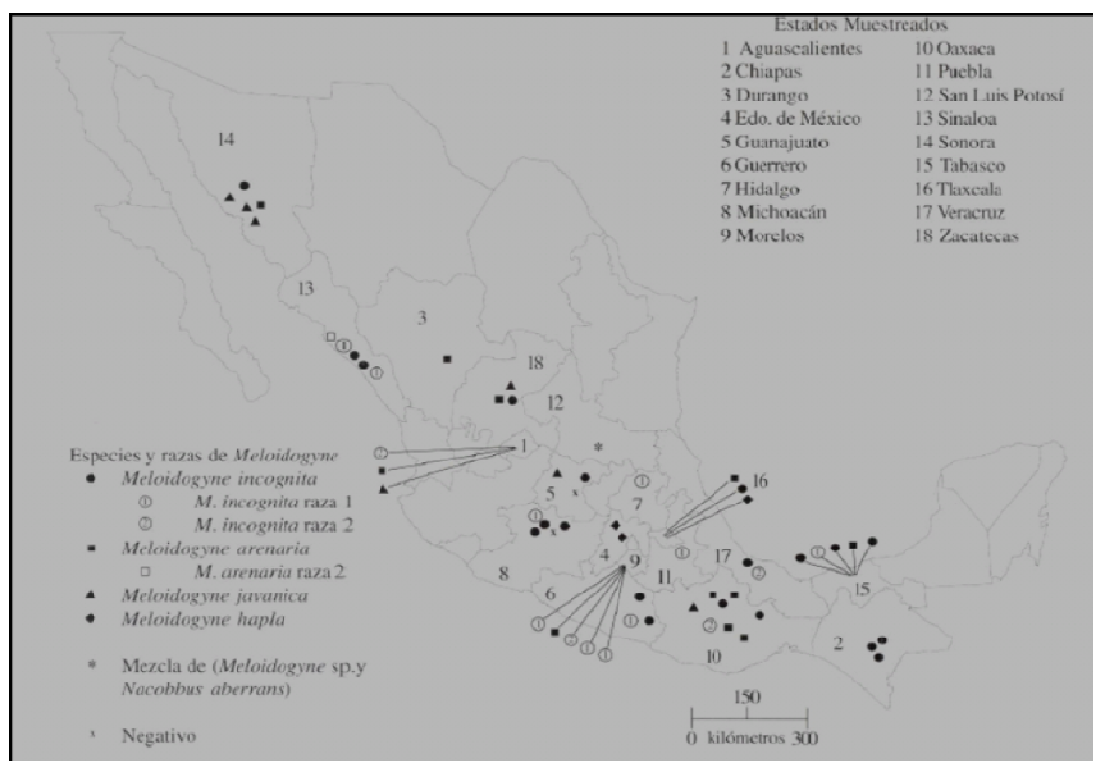


Figura 2.2 Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* spp., en México (Cid del Prado, 2001)

2.7 Pérdidas económicas ocasionadas por nemátodos

Las pérdidas de rendimientos van entre el 50-70% en cultivos causados por *Meloidogyne* spp., están relacionadas con el acortamiento del periodo útil de las plantaciones y mermas de rendimientos. Estos nemátodos están considerados como los más perjudiciales en la agricultura, causando un estimado de 100 billones de pérdidas anuales a nivel mundial (Abad *et al.*, 2003; Pino, 2010).

Entre las especies económicamente más importantes por el grado de daño que causan a los cultivos se encuentran; *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Arias *et al.*, 2009).

M. incognita habita en climas tropicales y es el parásito más dañino de los cultivos en el mundo (Arias *et al.*, 2009).

2.8 Características del nemátodo agallador *Meloidogyne* spp.

2.8.1 Biología

Generalmente pasan el invierno en el suelo en forma de huevos. En primavera conforme la temperatura del suelo se incrementa, los juveniles de segundo estado, eclosionan, y migran a través del suelo y penetran en las raíces de las plantas hospedadoras, donde establecen sitios de alimentación (Karssen *et al.*, 2006).

Durante el crecimiento, los juveniles van engrosando y mudando hasta convertirse en hembras adultas o machos. Las hembras son redondeadas e inmóviles, los machos filiformes y generalmente abandonan la raíz pues no se alimentan. Las hembras producen hasta 3000 huevos envueltos en una masa gelatinosa. Generalmente los nemátodos agalladores completan su ciclo en menos de un mes dependiendo de la temperatura del suelo y por tanto puede tener varias generaciones durante un cultivo (Talavera, 2003).

2.8.2 Características morfológicas

La morfología de los nemátodos formadores de agallas cambia durante su ciclo de vida y se caracteriza por presentar un marcado dimorfismo sexual (Hunt *et al.*, 2005).

Los huevos de *Meloidogyne* spp., están retenidos dentro de una matriz gelatinosa secretada por la hembra y tienen aproximadamente de 50 a 100 μm de longitud y de 20 a 50 μm de ancho (Wright *et al.*, 2006). La cubierta o cáscara del mismo está

constituída por una capa vitelina exterior, una capa quitinosa media y una capa glicolipídica interior. La capa glicolipídica permite que los huevos de los nemátodos formadores de agallas sean muy resistentes a los productos químicos (Stirling, 1991).

Los juveniles de segundo estado son infestivos, frecuentemente libres en el suelo y tienen usualmente entre 250 a 600 μm de longitud; el esqueleto de la región cefálica es débil y el estilete es delicado con pequeñas cabecitas basales, con 9 a 16 μm de longitud; la cola es conoide y termina en una punta estrecha y redondeada, con una región hialina clara cuya extensión permite distinguir entre especies (Karssen *et al.*, 2006).

Las hembras son redondeadas o globosas, de 350 μm a 3 mm de longitud de color blanco perlado. La cutícula de la región perineal forma un patrón característico para cada especie del genero de *Meloidogyne* spp., y el estilete es corto y delicado de 10-25 μm (Karssen *et al.*, 2006).

Los machos son vermiformes, móviles y no se alimentan, tienen de 600 a 2500 μm de longitud. El estilete mide de 13 a 33 μm para la mayoría de las especies (Karssen *et al.*, 2006).

2.8.3 Ciclo de vida

Una vez que los juveniles de segundo estado abandonan el huevo, si se encuentran en el interior de las raíces, infectan los tejidos cercanos y si por el contrario se encuentran en el exterior, migran en el suelo en busca del hospedante.

Los juveniles de segundo estado, en su penetración y movimiento, utilizan medios mecánicos y químicos. Como su estilete no es tan robusto que les permita perforar las paredes celulares, se plantea que segregan enzimas digestivas que debilitan la lámina media entre las células (Fenoll *et al.*, 1998). Aunque el movimiento vigoroso de sus cuerpos provoca el debilitamiento de las paredes celulares, esta no es una migración destructiva; dicha migración sigue un patrón característico de

comportamiento, compuesto por movimientos continuos de la cabeza conjugada con períodos de introducción de la punta del estilete y bombeo de las glándulas esofágicas. Este comportamiento se mantiene durante todas las fases del parasitismo: invasión de las raíces, migración intercelular y alimentación a partir de las células gigantes (Wyss *et al.*, 1992; Gheysen *et al.*, 2006).

Cuando los juveniles de segundo estado alcanzan el cilindro vascular en desarrollo, reconocen una célula particular y se establecen; dicha célula será la precursora del sitio de alimentación permanente. Los componentes de las secreciones de los nemátodos son los responsables de disparar los mecanismos implicados en la inducción de dichos sitios de alimentación (Keen *et al.*, 1998; Abad *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2003).

El tamaño de la agalla está relacionado con la planta hospedante, el número de juveniles de segundo estado y la especie de nemátodo (Karssen *et al.*, 2006).

Después de establecidos los nemátodos en el sitio de alimentación, los músculos de la pared de su cuerpo degeneran y quedan atrapados en el interior de las agallas (Fenoll *et al.*, 1998; Keen *et al.*, 1998). A partir de este momento dependen absolutamente de dicha zona para abastecerse de agua y de nutrientes (Abad *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, 1999).

Una vez inmovilizados, pasan por una segunda, tercera y cuarta muda hasta alcanzar la fase adulta y la madurez sexual. Durante la última muda los machos cambian dramáticamente su forma y abandonan la raíz. Las hembras comienzan a engrosar su cuerpo y como consecuencia provocan ruptura de los tejidos de la planta quedando conectadas con su estilete al sitio de alimentación. Las hembras se reproducen asexualmente y segregan una matriz gelatinosa dentro de la cual depositan cientos de huevos (Karssen *et al.*, 2006).

Los huevos inmersos en esta matriz gelatinosa, pueden quedar en el exterior de los tejidos o encerrados en el interior de la raíz hasta su eclosión. Dentro de los huevos se forma el primer estado larval y se produce la primera muda antes de eclosionar

(Karszen *et al.*, 2006). La producción de huevos es un proceso muy perjudicial para la planta infestada, la formación de los mismos supone una gran demanda de agua, nutrientes y productos de la fotosíntesis (Fenoll *et al.*, 1998).

2.8.4 Síntomas

Los síntomas en la parte aérea son muy variados; desde marchitez a enanismo, pasando por amarilleamiento más o menos intensos. Es decir, síntomas similares a los causados por otros patógenos o accidentes de suelo. El sistema radical de las plantas afectadas se muestra de tamaño reducido y desarrolla pequeñas agallas por debajo de las cuales la raíz aparece más delgada de lo normal. La enfermedad suele desarrollarse en rodales localizados en la parcela de cultivo. El mayor número de agallas suele encontrarse entre los 5 y 25 cm de profundidad (Nuez, 1996).

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. En las raíces infectadas por algunas de las especies de este nemátodo se forman, además de agallas, varias ramificaciones cortas de la raíz, las cuales nacen en la parte superior de la agalla y forman un sistema radicular denso y tupido. Sin embargo, es frecuente que las raíces infectadas sean más pequeñas y muestren varios grados de necrosis. Con frecuencia se produce la pudrición de las raíces particularmente a finales de la estación (Agrios, 2005).

2.9 Como afecta el nemátodo a la planta

Se ha demostrado que los nemátodos juveniles de segundo estado son atraídos por emanaciones de CO₂ y aminoácidos provenientes de la zona de elongación y áreas de emergencia de raíces laterales, que son captadas por sus órganos cefálicos sensoriales, fundamentalmente las anfidias (Karszen *et al.*, 2006).

Los nemátodos interfieren en la producción y traslocación de sustancias provenientes de las raíces como las hormonas giberelinas y citoquininas, y también de sustancias que regulan la fotosíntesis; Al menor tamaño del sistema radical y a que los elementos vasculares en los nódulos se rompen y se deforman, interrumpiendo mecánicamente el flujo normal de agua y nutrientes. Como resultado, aparecen síntomas de deficiencia, los cuales conllevan a la disminución de los rendimientos, en dependencia de la severidad de la infestación del suelo. En el sitio de alimentación, los nemátodos inducen un proceso de rediferenciación que conlleva a la formación de células de alimentación multinucleadas, llamadas células gigantes (Figura 2.3), resultado de divisiones nucleares repetidas de la célula nodriza inicial sin citoquinesis.

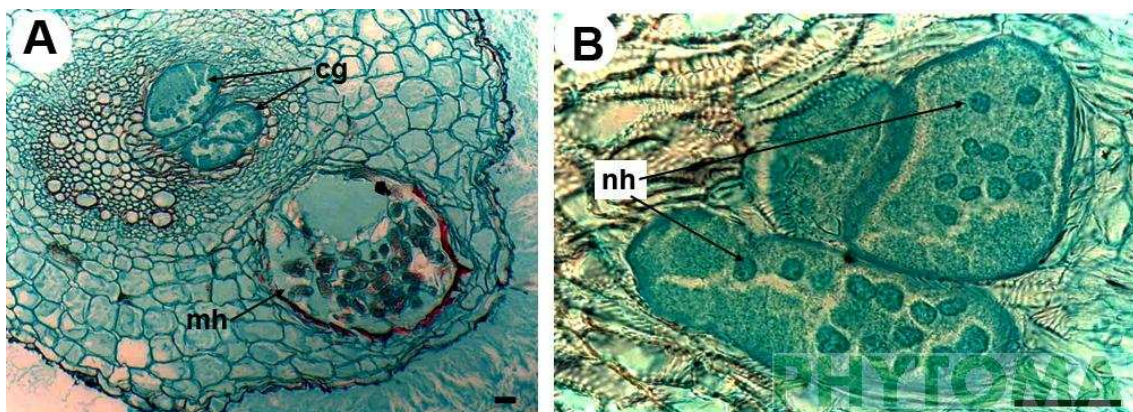


Figura 2.3 Corte transversal de una agalla en raíz de tomate infectada por *Meloidogyne* spp., mostrando un sitio permanente de alimentación. A) Constituido por varias células gigantes (cg) y observación de una masa de huevos (mh) en el interior del parénquima cortical. B) Detalle de las células gigantes multinucleadas mostrando varios núcleos hipertróficos (nh), fuente: (http://www.phytoma.com/gallery_detalle.php?id=1071)

Cada nemátodo desencadena el desarrollo de hasta doce células gigantes, cada una conteniendo aproximadamente 100 núcleos. Los múltiples núcleos en las células gigantes resultan de la mitosis desacoplada de la citoquinesis. Además, los núcleos individuales tienen alto contenido de ADN, indicando que ha ocurrido la

endoreduplicación. Las células gigantes son metabólicamente activas, con un citoplasma denso que contiene numerosas mitocondrias, plastidios, ribosomas, un aparato de Golgi y un retículo endoplasmático liso bien desarrollado, generalmente organizado en remolinos. La vacuola central desaparece, dando lugar a pequeñas vacuolas. Además, se desarrolla el decrecimiento típico de la pared celular. Se piensa que este fenómeno aumenta la toma de solutos del sistema vascular. Cerca, las células de la corteza, el periciclo y el parénquima vascular aumentan de tamaño y se dividen, formando la agalla (Arias *et al.*, 2009). En la Figura 2.4 se muestran algunos de los mecanismos involucrados durante la invasión del nemátodo agallador *Meloidogyne* spp., en la raíz.

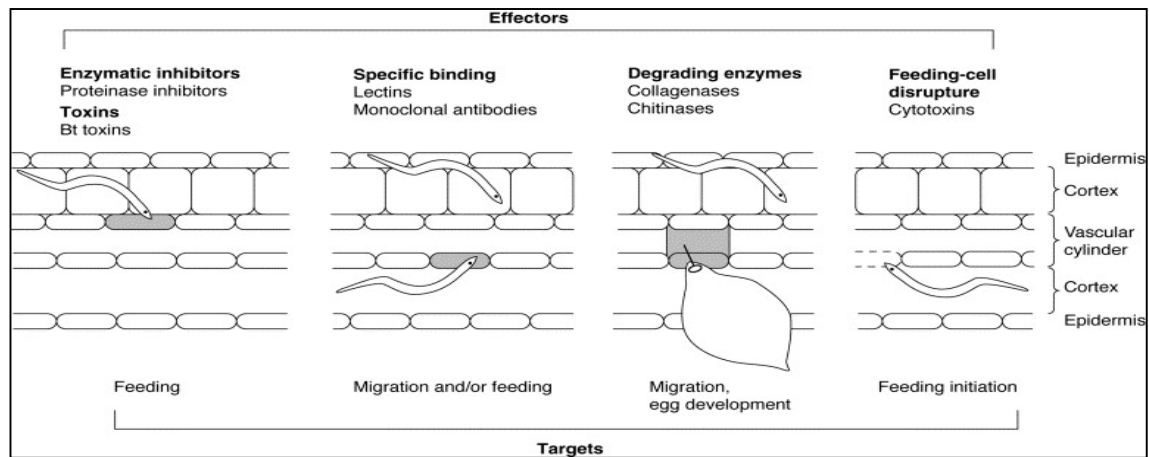


Figura 2.4 Mecanismo de invasión de *Meloidogyne* spp., a la raíz de la planta (Jung et al., 1998)

2.10 Interrelación entre los nemátodos y otros fitopatógenos

Aunque los nemátodos pueden causar enfermedades en las plantas por sí mismos, la mayoría de ellos viven y operan en el suelo donde constantemente están rodeados por hongos y bacterias, muchas de las cuales pueden también causar enfermedades en las plantas. En la mayoría de los casos se produce una asociación entre los nemátodos y algunos de los demás patógenos. Los nemátodos forman entonces parte de un complejo etiológico que da origen a un potencial patogénico combinado

mucho mayor que la suma del daño que pueden producir los patógenos por separado (Agrios, 2005).

Los nemátodos fitoparásitos casi siempre juegan un papel importante en la interacción de enfermedades. La presencia de *Meloidogyne* spp. aparentemente favorece el desarrollo de la marchitez debida a *P. solanacearum*. Se cree que los mecanismos de la reacción sinérgica de *M. incognita* y *P. solanacearum* son el daño mecánico así como los cambios fisiológicos de la planta causados por la infección del nemátodo (Hidalgo *et al.*, 1990).

2.11 Métodos de control

El éxito de los métodos de control depende de la selección y combinación adecuada de las tácticas de control que se adaptan a cada situación, por lo que es necesario caracterizar el problema fitopatógeno, conocer la abundancia, biología e interacción de los nemátodos con el cultivo. Con tales conocimientos es posible implementar métodos específicos y considerar el uso de plaguicidas, solo como herramienta complementaria. Entre los principales métodos utilizados se encuentran: control legal, cultural, físico, químico y biológico.

2.11.1 Legal

El control de los nemátodos mediante regulación fitosanitaria incluye el cumplimiento de cuarentenas como la NOM-025-FITO-2000 y NOM-069-FITO-1995, para impedir la introducción y diseminación de un determinado nemátodo fitoparásito en áreas conocidas como libres de esa especie. Esta medida es efectiva solamente cuando se conoce la naturaleza de ese determinado nemátodo y se hacen cumplir las regulaciones. A pesar de esas fallas y limitaciones, la acción reguladora ha reducido sin duda la distribución de algunos nemátodos parásitos (Parviz, 1986).

El saneamiento es importante para prevenir la introducción de material vegetal infestado con nemátodos en áreas donde esa enfermedad no está presente. Para

lograrlo es necesario prohibir la producción vegetal en áreas infestadas y prevenir el transporte de nemátodos en el suelo contaminado, maquinaria y herramientas (Parviz, 1986).

2.11.2 Cultural

La mayoría de las prácticas o labores de cultivo tienen un impacto directo o indirecto sobre la incidencia y severidad de las enfermedades ocasionadas por organismos del suelo (Widmer, 2002).

Barbecho

Consiste en dejar el suelo sin cultivar por un cierto período, principalmente durante los meses de primavera y verano, removiéndolo en forma periódica (Noling, 1999). Tiene como inconveniente que, los cultivos posteriores al barbecho pueden reducir su productividad debido a la eliminación de organismos benéficos (Duncan, 1991). Cuando la erosión del suelo representa un problema potencialmente serio, deben considerarse otras medidas.

Rotación de cultivos

La rotación de cultivo en algunas regiones, reduce significativamente las poblaciones de *Meloidogyne* spp., con una secuencia que incluya cultivos no hospedantes como trigo de invierno y luego un cultivo resistente como por ejemplo soja, por lo que es potencialmente útil incluir en las rotaciones plantas no hospedantes y cultivares resistentes (Clark 1991). Su efectividad depende de la selección adecuada de la secuencia de cultivos a emplear, a partir de la identificación de especies y razas de nemátodos presentes, así como sus niveles poblacionales (Duncan, 1991).

En los sistemas intensivos de producción de hortalizas en nuestro país se dificulta la aplicación de este método por la gran cantidad de especies hospedantes de *Meloidogyne* spp., que se cultivan. No obstante, existen especies hortícolas como

cebolla, ajo, col, coliflor y otras crucíferas que son ligeramente susceptibles o resistentes a *Meloidogyne* spp., por lo que pueden incluirse en sistemas de rotación (Fernández *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 1996).

2.11.3 Físico

Consiste en la utilización de algún agente físico que resulte letal para los nemátodos. El tratamiento del suelo con calor, la inmersión de las plantas en agua caliente, la electricidad, la radiación, inundación y vapor son métodos utilizados para el control físico de los nemátodos. Sin embargo estos métodos son efectivos solamente cuando se usan en pequeña escala, por ejemplo en invernaderos o almácigos (Parviz, 1986).

2.11.4 Químico

El control químico de los nemátodos depende de que los productos tóxicos utilizados (llamados nematocidas) actúen sobre el nemátodo y sean capaces de matarlo. La manipulación de los productos químicos es a menudo difícil y peligrosa para el personal (Parviz, 1986).

Dado que los nemátodos del género *Meloidogyne* spp., son muy prevalentes en la mayoría de los campos, se debe tratar el suelo con productos nematocidas. Con productos no fumigantes, como los organofosforados y carbamatos que afectan al sistema nervioso del nemátodo, impidiendo su alimentación; no son fitotóxicos, por lo que pueden aplicarse una vez plantado el cultivo; son menos agresivos con el ambiente, de fácil manipulación y algunos son sistémicos; no eliminan totalmente las poblaciones de nemátodos sino que las mantienen a niveles tolerables, se recomienda su uso a densidades poblacionales de medias a bajas (Gowen *et al.*, 1997; Tamayo, 2001).

2.11.5 Biológico

La agricultura actual demanda la reducción de plaguicidas químicos y la introducción de sistemas sostenibles con el uso de agentes de manejo biológico. La alternativa de usar hongos y bacterias para el manejo de nemátodos fitoparásitos puede ser una opción biológica muy importante de actualidad. El manejo biológico de nemátodos fitoparásitos es posible si se logra fomentar e investigar la utilización de hongos y bacterias que pueden estar en el suelo o reproducirse en laboratorios para uso comercial.

El primer concepto que debemos tener en mente al tratar este tema es el suelo supresivo, es decir, un suelo en el cual los enemigos naturales se incrementan conforme los fitonematodos también se incrementan. El suelo mantiene un equilibrio entre los fitonematodos y los enemigos naturales del suelo y permite que el cultivo se pueda seguir cultivando a través de los años, sin ver reducciones en el rendimiento. Además estos suelos proveen las condiciones que son favorables para la reproducción y acción de los enemigos naturales para regular la población de fitonematodos. Por ejemplo un suelo seco no presenta condiciones óptimas para el desarrollo de hongos y su efecto sobre las poblaciones de fitonematodos es reducido (Cano *et al.*, 2004).

Los nemátodos fitoparásitos coexisten en la rizosfera interactuando con otros organismos de los cuales muchos han sido aislados e identificados como enemigos naturales de los nemátodos y estos ejercen algún grado de control biológico natural en los agro-ecosistemas (Cano *et al.*, 2004).

Los conocimientos sobre organismos antagónicos de nemátodos fitoparásitos son casi tan viejos como los que se tienen sobre la importancia económica de estos en la producción agrícola; es decir, los nemátodos fitoparásitos tienen “enemigos” muy eficaces que limitan sus niveles poblacionales, además, se tiene el conocimiento de la existencia de una microflora y microfauna en el suelo cuyas especies son antagonistas o reguladoras de las actividades de los fitonematodos. A escala

mundial, existe una gran abundancia de antecedentes que permiten aseverar que los nemátodos son atacados por numerosos y variados organismos del suelo, pero la acción de ellos aún es poco conocida (Jiménez, 1979).

Los agentes biocontroladores como los organismos que interactúan con los nemátodos fitoparásitos en el suelo deben tener algunas características básicas: no deben ser patógenos de plantas, hombres o animales, capaz de reducir o suprimir eficientemente las poblaciones de nemátodos por debajo del nivel crítico, capacidad de adaptación a diferentes ambientes del suelo (textura, grado de humedad, composición química y materia orgánica), buena habilidad competitiva, alto potencial de reproducción para obtener una población alta, capacidad de sobrevivir en épocas difíciles, capacidad de producir antibióticos u otros compuestos que inhiben nemátodos u otros organismos para mejorar su oportunidad de supervivencia, habilidad para afectar a más de una especie de nemátodos, dispersión efectiva en el suelo, capacidad para reproducirse in vitro en grandes cantidades a nivel comercial y de fácil aplicación, resistencia a la fertilización y a algunos plaguicidas.

A los agentes biocontroladores formulados para su uso comercial se les ha denominado plaguicidas microbiales o bioplaguicidas, con las respectivas categorías, como bioinsecticida, biofungicida, bioherbicida y bionematicida.

2.11.6 Control integrado o manejo de los nemátodos

Aunque todos los métodos de control tienen sus méritos, no es deseable aplicar continuamente el mismo método. En la práctica es necesario integrar o combinar diferentes métodos de control para mantener la densidad de población de nemátodos por debajo de los niveles perjudiciales y para prevenir su diseminación a nuevas áreas (Parviz, 1986).

2.12 Enzimas

Las enzimas son, desde el punto de vista bioquímico, proteínas que actúan como aceleradores de las reacciones químicas y biológicas a través de vías bien definidas y cuya actividad está sujeta a diversos mecanismos de regulación. La actividad de las enzimas y su modo de acción son propiedades que muestran dependencia del pH y la temperatura. Son biomoléculas complejas producidas por las células de organismos vivos, esenciales para su funcionamiento, cuya propiedad más importante es su alta especificidad de sustrato (Hernández, 2006).

Durante los últimos años su utilidad en gran cantidad de industrias ha adquirido gran relevancia siendo las proteasas el grupo de enzimas de mayor importancia industrial (Brandan *et al.*, 2008).

El uso de las enzimas en la agricultura está adquiriendo mucha preeminencia, debido a que ayudan a acelerar muchos procesos que de su forma natural llevarían mucho tiempo, ayudan a reducir el uso y producción de sustancias químicas utilizadas para controlar microorganismos patógenos (Sáenz *et al.*, 2009).

2.12.1 Clasificación de las enzimas

Muchas enzimas se nombran añadiendo el sufijo “asa” al nombre de su sustrato o una palabra o frase que describe su actividad. Así la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea y la ADN polimerasa cataliza la síntesis de ADN. Otras enzimas, tales como la pepsina y la tripsina tienen nombres que no se refieren a sus sustratos. A veces la misma enzima tiene dos o más nombres, o dos enzimas diferentes tienen el mismo nombre. Debido a la diferencia y número creciente de enzimas descubiertas, se ha adoptado por acuerdo internacional un sistema de nomenclatura y clasificación de las enzimas (Hernández, 2006).

Según el tipo de reacción que catalizan las enzimas se dividen en 6 clases o grupos (Branda *et al.*, 2008); como se describen en el Cuadro 2.2 según la fuente de Hernández (2006).

Cuadro 2.2 Clasificación internacional de las enzimas (Lehninger, 1993).

No.	Clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxido reductasas	Transferencia de electrones (Iones hidruro o átomos de H)
2	Transferasas	Reacción de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacción de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua)
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por formación de grupos.
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de la molécula dando formas isoméricas.
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O, C-N, mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP.

Fuente: (Hernández, 2006).

2.12.2 Generalidades sobre las proteasas

Las proteasas son endopeptidasas que actúan sobre las proteínas hidrolizando enlaces peptídicos (Sáez, 2005). Actualmente una gran proporción disponible de las proteasas comerciales son derivadas de cepas de *Bacillus* spp., aunque también las de origen fúngico han sido empleadas y representan 30 del 40% del costo de producción de las enzimas industriales (Vázquez *et al.*, 2008).

Las enzimas proteolíticas representan aproximadamente el 60% de las enzimas industriales comercializadas mundialmente (García *et al.*, 2012).

En términos económicos, las proteasas representan casi las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mercado mundial. La mayor parte de estas provienen de fuentes microbianas, pero varias proteasas vegetales como papaína, bromelina y ficina, son irremplazables en un gran número de procesos (Hernández

et al., 2005), por ello se han desarrollado técnicas para la purificación de proteínas, entre las que se encuentran el FPLC (Fast protein liquid chromatography). El FPLC es una forma de cromatografía de líquidos que se utilizan a menudo para analizar o purificar mezclas de proteínas. Al igual que en otras formas de cromatografía, la separación es posible debido a que los diferentes componentes de una mezcla tienen diferentes afinidades para dos materiales, de un fluido en movimiento (la fase móvil) que pasa a través de un sólido poroso (fase estacionaria) (http://web.mnstate.edu/biotech/chrom_fplc.pdf).

2.12.3 Clasificación

Las enzimas proteolíticas (comúnmente llamadas proteasas) pertenecen al grupo de las Hidrolasas, ya que catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Un enlace peptídico es la unión que se realiza entre el grupo ácido de un aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua.

Dependiendo de la naturaleza del sitio sobre el cual actúan las proteasas, éstas se clasifican en:

- a) Endopeptidasas: son aquellas enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de una proteína (tripsina y quimotripsina) dando como resultado cadenas de péptidos.
- b) Exopeptidasas: actúan sobre enlaces terminales de una proteína (aminopeptidasa y carboxipeptidasas). Basándose en su sitio de acción sobre el N o el C terminal.
- c) Aminopeptidasas: actúan sobre el N libre terminal de la cadena polipeptídica liberando un aminoácido o un dipéptido o tripéptido.
- d) Carboxipeptidasas actúan sobre el C terminal de la cadena polipeptídica. Se subdividen en cuatro subgrupos dependiendo de su mecanismo catalítico y al grupo funcional presente en su sitio activo (Alquicira, 2003).

2.12.4 Aplicación agrícola de las enzimas

Actualmente se está desarrollando la lucha biológica y como principal componente de esta se encuentra el control biológico el cual abarca desde la represión o control de insectos hasta las enfermedades causadas por nemátodos, hongos, bacterias y virus. Para su control se han utilizado microorganismos los cuales ejercen una actividad antagónica contra dichas enfermedades, debido a la acción de algunos metabolitos presentes (Razo *et al.*, 2012), entre estos microorganismos se encuentran *Bacillus licheniformis* y *Trichoderma harzianum*.

A nivel mundial numerosos grupos de investigadores y empresas productoras se concentran en el desarrollo de productos comerciales a partir de hongos que tienen la capacidad de secretar diferentes enzimas de interés agronómico obtenidos muchas veces a través de sistemas de fermentación sumergida, también llamado fermentación líquida, en el que los sustratos están disueltos ó suspendidos en un medio acuoso y son agitados para conservar la homogeneidad del sistema(Ramirez, 2009) induciendo a la secreción de enzimas para la formulación de productos. Algunos de estos productos se encuentran en forma de gránulos o como polvo hidratable, los cuales se mencionan en el Cuadro 2.3.

Cuadro 2.3 Empresas generadoras de productos biológicos en base a microorganismos.

Empresa	Microorganismo	Nombre comercial
SIAPA, Italia	<i>F. oxysporiumy</i> <i>F. moniliforme</i>	Biofox C
Mycotech	<i>B. bassiana</i>	Mycotrol GH
CABI Bioscience UK	<i>M. flavoviride</i>	Green Muscle
Agrobionsa, Culiacán Sin.	<i>B. bassiana</i>	Bea-Sin
Mycotech, México DF	<i>B. bassiana</i>	Botani Gard
CESAVEG, Irapuato, Gto	<i>M. anisopliae</i>	Fitosan-M
CESAVEG, Irapuato, Gto	<i>B. bassiana</i>	Bio-Fung

Fuente: (Carrillo *et al.*, 2009).

2.13 Importancia agrícola

El uso excesivo de sustancias químicas para el control de plagas y enfermedades ha causado problemas de daños al medioambiente, a la salud humana y de resistencia a plagas, situación que ha provocado preocupación en el mundo, por lo que se han dirigido las fuerzas hacia la búsqueda de alternativas no contaminantes, y entre ellas el desarrollo de un proceso tecnológico para la obtención, producción masiva y uso de bioplaguidas para el control biológico (Carrillo *et al.*, 2009).

Diversos estudios han ido marcando la necesidad del estudio de las proteasas en la agricultura a partir de microorganismos, uno de los estudios realizados en *Bacillus* spp., demuestran la capacidad del organismo para la producción de proteasas, donde el sobrenadante del cultivo de la bacteria muestra la capacidad de degradar la cutícula de los nemátodos, mostrándose un índice de mortandad del 80% (QiuHong, 2006).

2.14 Microorganismos productores de proteasas

Está demostrado que la actividad entomopatógena de los hongos depende de su equipamiento enzimático, ya que para la penetración de la cutícula del nemátodo, se requiere de la acción de enzimas hidrolíticas, encontrándose entre las más estudiadas: proteasas, quitinasas, lipasas, quitobiosas, lipooxigenasas y otras enzimas hidrolíticas, que van degradando los componentes cuticulares importantes y proporcionan nutrientes para una mayor proliferación del hongo (Carrillo *et al.*, 2009).

El hongo *Lecanicillium* spp., es uno de los muchos microorganismos productores de proteasas alcalinas usados como bionematicidas, obtenidos a partir de fermentación sumergida (Gómez *et al.*, 2010).

Ciertos estudios realizados han demostrado que *Verticillium lecanii*, tiene actividad proteolítica, reportado que este hongo segrega una sustancia dañina a los huevos de los nemátodos del género *Meloidogyne* spp., por lo que presenta potencialidades promisorias para su empleo como controlador de nemátodos (Gómez *et al.*, 2004).

Entre muchos de los microorganismos estudiados y que presentan la capacidad de producir proteasas se encuentran; *Bacillus extremofilos* (Dash *et al.*, 2003), *Bacillus alcalofilico* cepa 5A71 (Sáez *et al.*, 2004), *Bacillus nematocida* (Niu *et al.*, 2006), *Trichoderma harzianum* (Delgado *et al.*, 2002), entre otros.

Se han realizado estudios de forma exitosa con *Bacillus licheniformis*., donde diversos experimentos han demostrado que las cepas de *Bacillus licheniformis* reduce el porcentaje en la eclosión de los huevos de *Meloidogyne incognita*, donde existe un efecto combinado de naturaleza enzimática sobre la pared de los huevos y que inhibe el proceso de eclosión.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el centro de investigación Biorganix Mexicana S.A de C.V. en Ramos Arizpe, Coahuila, y la colaboración de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo Coahuila.

3.2 Metodología

Para su desarrollo se realizó en cuatro etapas importantes:

3.2.1 Selección de cepas productoras de proteasas mediante ensayos en placa.

Las cepas del género *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. fueron tomadas del cepario de Biorganix Mexicana S.A. de C.V. En esta etapa se evaluaron 2 cepas de bacterias del género *Bacillus* spp denominadas en este estudio como BSJ, BSM. y 2 cepas de hongos del género *Trichoderma* spp. denominadas como; TH y TH9, además se utilizaron tres medios de cultivo con diferentes fuentes de proteínas para determinar la cepa con mayor potencial de producción de enzimas proteasas, como se describen en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Nomenclaturas utilizadas en la metodología experimental.

Cepas	Nomenclatura	Medios de cultivo	Nomenclatura
<i>Bacillus</i> spp.	BSM	Proteína de suero	PS
		Leche de soja	LS
		Leche descremada	LD
<i>Bacillus</i> spp.	BSJ	Proteína de suero	PS
		Leche de soja	LS
		Leche descremada	LD
<i>Trichoderma</i> spp.	TH	Proteína de suero	PS
		Leche de soja	LS
		Leche descremada	LD
<i>Trichoderma</i> spp.	TH9	Proteína de suero	PS
		Leche de soja	LS
		Leche descremada	LD

Las cepas fueron propagadas en placas Petri con agar de dextrosa y papa (PDA) suplementado con 1% de PS, LS, LD, colocando un disco de papel al centro de la caja Petri con un inóculo de 1×10^8 cel/mL. Las condiciones de cultivo para las cepas bacterianas fueron de 32°C por 24 h, mientras que los hongos fueron cultivados a 27°C por 72 h, utilizando explantes de 1 cm² aproximadamente, inoculando al centro de la caja. Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones por microorganismo. Una vez transcurrido este lapso de tiempo se procedió a seleccionar las cepas que presentaron mayor actividad proteolítica mediante el índice de potencia (Dh/Dc) (García *et al.*, 2012).

$$\text{Índice de potencia} = \frac{\text{Diámetro del halo de la hidrólisis}}{\text{Diámetro de la colonia}} = \text{IP} = \frac{\text{Dh}}{\text{Dc}}$$

3.2.2 Evaluación de la producción de proteasas a escala de laboratorio

Las cepas seleccionadas en la etapa anterior denominadas BSM y TH9, se cultivaron en un medio salino basal (descrito por William, 1991), adicionado con 1% de PS, con 2 repeticiones para cada de los medios en cada uno de los 5 tiempos (0, 24, 48, 72, 96 h). El inóculo fue cultivado en caldo nutritivo por 24 h, una vez pasado este lapso de tiempo se determinó la concentración de células a través del espectrofotómetro a

una longitud de onda de 560 nm. La cantidad de inóculo utilizado por cada matraz fue de 1×10^6 cel/mL de cada cepa bacteriana cultivándose en el Shaker (Marca FINEPCR y modelo combi-SU12) a una temperatura de 32°C por 150 rpm; para los hongos, el inóculo fue extraído por barrido para luego realizar el conteo de esporas en el microscopio, una vez teniendo la concentración de esporas por mL, se inóculo en los matraces una cantidad de 9×10^8 cel/mL cultivándose en el Shaker (Marca FINEPCR y modelo combi-SU12) a 27°C por 150 rpm. Al tiempo 0 h, se sacrificó un matraz de cada repetición de las cepas BSM y TH9, las muestras fueron filtradas en papel Whatman No. 41 y posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos en tubos Eppendorf, almacenando el sobrenadante en tubos de rosca para luego realizar la determinaciones de azúcares totales, proteínas, actividad enzimática y biomasa.

Determinación de azúcares totales para las cepas BSM Y TH9.

Se prepararon soluciones una de fenol al 5% y de glucosa al 5% para realizar la curva patrón (Figura 3.1) por el método de Dubois (Dubois, 1956), una vez teniendo la curva patrón, se procedió a la determinación de azúcares totales de las muestras, añadiendo 100 μ L de la muestra problema a los tubos de ensayo, 200 μ L de fenol y 1 mL de ácido sulfúrico concentrado en la campana de humos, luego se llevo al vortex, se dejo incubar por 15 minutos y por último se procedió a leer las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

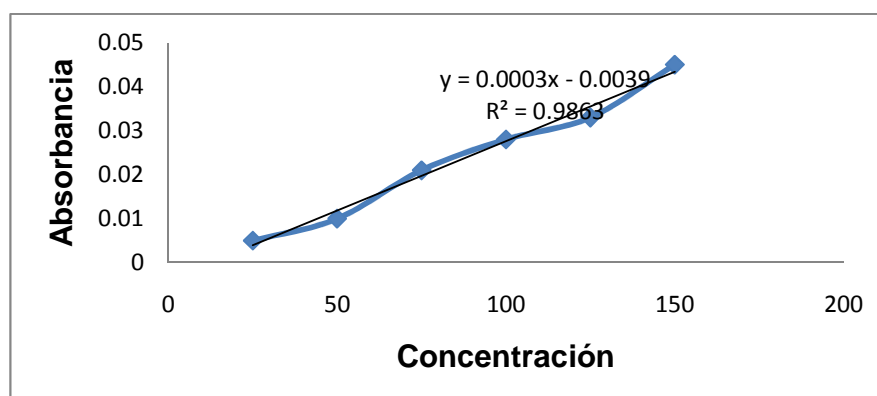


Figura 3.1 Curva patrón de azúcares totales por el método de Dubois

Determinación de proteínas para las cepas BSM Y TH9

Se utilizó la albumina al 5% como proteína estándar para la elaboración de la curva patrón(Figura 3.2) por el método de Bradford (Nielsen, 2003), una vez realizada la curva patrón, se realizó el análisis de proteína de la muestra, añadiendo 100 μ L de la muestra problema a los tubos ensayo y 1mL del reactivo de Bradford (Marca BIO-RAD), posteriormente se llevó al vortex, una vez terminado este proceso se incubó por 10 minutos y finalmente se realizó la lectura a 595 nm en un espectrofotómetro.

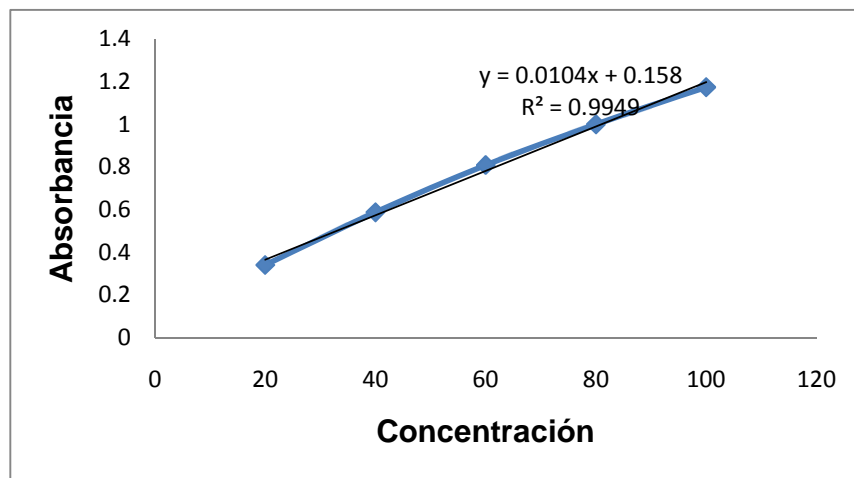


Figura 3.2 Curva patrón de proteínas por el método de Bradford

Actividad enzimática para las cepas BSM Y TH9.

La determinación de actividad proteolítica se realizó mediante el método de LiuFang (1998), utilizando 450 μ L de muestra más 50 μ L de albumina como sustrato incubando un tiempo de 10 minutos, al término de este tiempo las reacciones fueron suprimidas con 500 μ L de ácido tricloroacético al 10 % (p/v). Se realizó una segunda incubación a 0°C por 30 minutos, el precipitado de proteínas se eliminó por centrifugación a 4,000 rpm por 10 minutos realizando la lectura a una longitud de onda de 280 nm en el espectrofotómetro.

Determinación de biomasa para la cepa TH9.

Se determinó la producción de biomasa por el método de peso seco para cada tiempo de incubación, por lo que se procedió a filtrar las muestras en papel Whatman No. 41 previamente pesado, una vez terminado el proceso de filtración, se colocaron las muestras en la estufa, secando las muestras a 65°C por 24 horas, una vez secada la biomasa de las cepas se pesó el papel filtro que contenía la biomasa y se determinó la biomasa por diferencia de peso.

Determinación de biomasa para la cepa BSM.

La producción de biomasa de la cepa BSM en medio de proteína de suero fue determinada mediante absorbancia a 560 nm (Basados en la relación de que el cambio de 0.1 de absorbancia es igual a $8 \cdot 10^8$ Cel/mL).

3.2.3 Evaluación de la efectividad biológica *in vitro* de los extractos de fermentación como nematocida.

a).- El muestreo fue realizado en un invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en donde se encontraban plantas infectadas de tomate (*Lycopersicum esculentum*), las muestras (5 muestras como de 200gr aproximadamente) de suelo fueron tomadas cerca de los tallos en donde se observaban síntomas de *Meloidogyne* spp. Una vez realizada la toma de muestras de suelo y plantas, los nemátodos fueron extraídos por la técnica de tamizado-centrifugado-flotación en azúcar, obteniéndose una alta concentración de nemátodos (con una media general de 12 nemátodos por cada 100µl).

b).- Los extractos de fermentación (resultado de la producción de proteasa de las cepas BSM y TH9, a escala de laboratorio) fueron filtrados a través de membranas con un tamaño de poro de 0.45 µ y posteriormente se realizó una segunda filtración a 0.2 µ, a través del sistema de filtración Millipore previamente esterilizado en autoclave a 120°C por 15 minutos.

c).- Una vez filtrados los extractos se probaron sobre los nemátodos en placa de Elisa, utilizando 100 μ L de nemátodos contando con una media aproximada de 15 nemátodos por esa cantidad, se evaluaron las concentraciones de 0.5, 1, 2 y 5 % por 4 repeticiones de cada uno de los extractos de fermentación ya filtrados y utilizando el medio de cultivo (proteína de suero) como testigo como se muestra en el Cuadro 3.2, incubando los tratamientos por 24 horas a 18°C , pasando las 24 h se procedió a contar los nematodos vivos y muertos para realizar un porcentaje calculado.

Cuadro 3.2 Identificación de tratamientos y concentraciones en la aplicación de metabolitos de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus licheniformis*.

Tratamientos		Concentraciones %
T1	Metabolitos <i>Trichoderma harzianum</i> (TH9)	0.5, 1, 2 y 5
T2	Metabolitos <i>Bacillus licheniformis</i> (BSM)	0.5, 1, 2 y 5
T3	Medio de cultivo TH9(testigo)	0.5, 1, 2 y 5
T4	Medio de cultivo BSM (testigo)	0.5, 1, 2 y 5

Análisis de datos.

El análisis estadístico se realizó con los datos obtenidos del porcentaje de mortalidad después de 24 horas de exposición a los metabolitos de TH9 y BSM a las concentraciones de 0.5, 1, 2 y 5% de cada uno. El diseño que se empleó fue un completamente al azar con arreglo factorial 4X4 con tres repeticiones en el paquete estadístico Rcran versión 2.12.2 para ello se realizó un análisis de varianza con comparación múltiple de medias de la prueba de Tukey ($\alpha 0.05$).

3.2.4 Purificación de proteínas mediante FPLC.

Los extractos de fermentación fueron centrifugados a 14,000rpm por 10 minutos, el sobrenadante se filtró a través de membranas con un tamaño de poro de .45 μ , el sobrenadante (metabolitos) fue fraccionado mediante FPLC (Fast proteín liquid chromatography) utilizando una columna de sephadex G-25 (Marca LG y modelo

AKTA prime plus) y posteriormente la determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford a cada una de las fracciones obtenidas de cada corrida.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección de cepas productoras de proteasas mediante ensayos en placa

Respecto a las cepas bacterianas evaluadas (BSJ y BSM), se obtuvo que el comportamiento del índice de potencia con respecto al tiempo aumentó en las primeras 48 h en ambas cepas de bacterias, sobresaliendo la cepa BSJ con el mayor valor de 1.9 a las 48 h en el medio LD como se muestra en la Figura 4.2, mientras que la cepa BSM obtuvo un valor inferior de 1.8 a las 48 h en el medio PS (Figura 4.1). Sin embargo, la selección de la cepa y el medio se realizó en base a la factibilidad económica del proceso en el medio por lo que se decidió seleccionar la proteína de suero por ser una proteína de bajo costo económico.

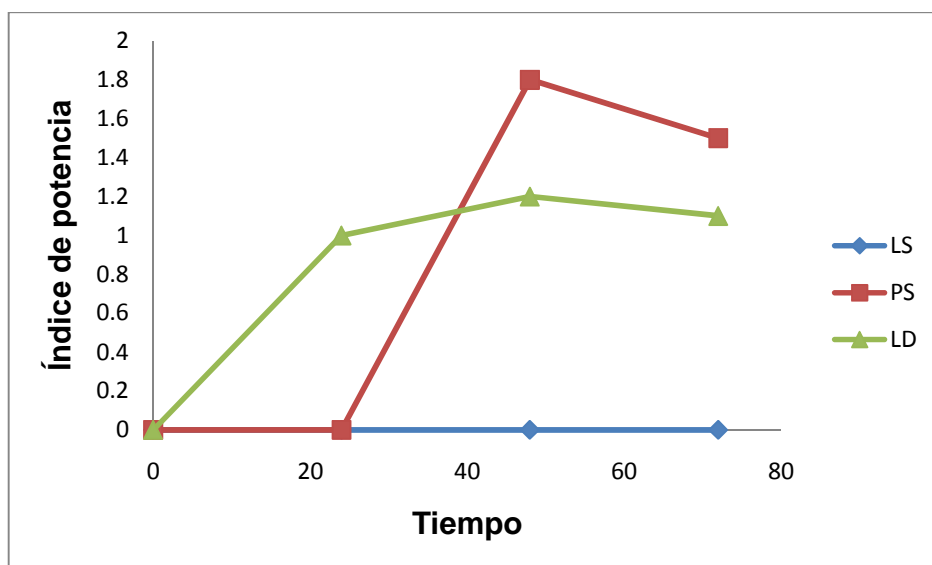


Figura 4.1 Cinética del índice de potencia respecto al tiempo en la cepa del género *Bacillus licheniformis* denominada BSM.

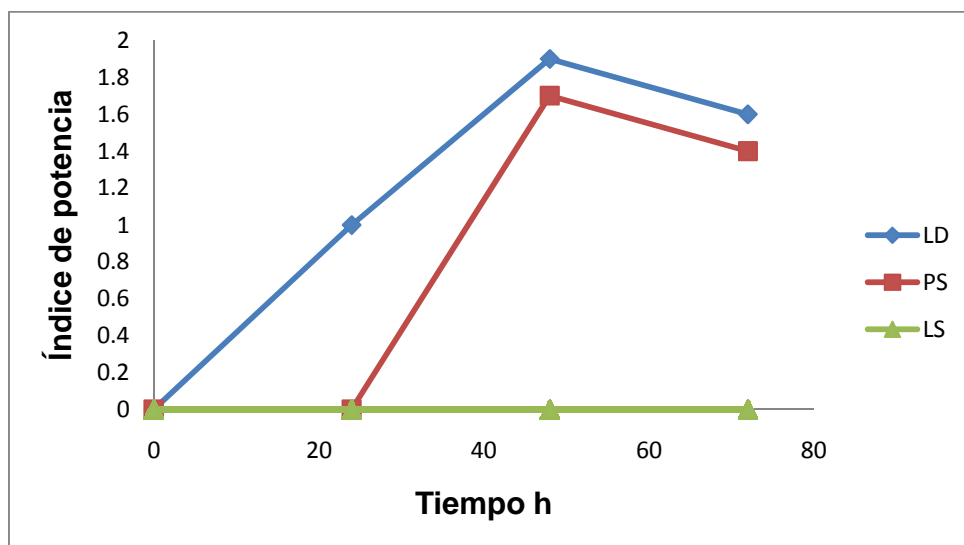


Figura 4.2 Cinética del índice de potencia respecto al tiempo en la cepa del género *Bacillus licheniformis* denominada BSJ.

Respecto a las cepas de hongos TH y TH9, se obtuvo que el comportamiento del índice de potencia respecto al tiempo fue ascendente a partir de las 24 h, alcanzando índice de potencia (IP) de 8 para la cepa TH9 a las 48 h en los tres medios de cultivo (Figura 4.3), mientras que la cepa TH, su índice de potencia fue de 6 a las 72 h (Figura 4.4) en los tres medios de cultivo; esta respuesta muestra que estas cepas tienen la capacidad proteolítica de hidrolizar diferentes tipos de proteínas. Lo encontrado en este estudio difiere por lo reportado por Valencia *et al.*, 2011 quienes encontraron un índice de potencia de 2 al evaluar una cepa de *Trichoderma* spp., mientras que en este estudio se reportó un valor superior a 8.

En la comparación de ambas cepas (*Trichoderma harzianum*) mostraron un comportamiento ligeramente diferente, donde TH9 tuvo una producción máxima (IP 8) a las 48 h y se mantuvo estable hasta las 72 h (Figura 4.3), en cambio TH obtuvo su máxima producción (IP 6) hasta las 72 h (Figura 4.4); por los resultados obtenidos de ambas cepas, se seleccionó a la cepa TH9, por obtener su mayor valor en el menor tiempo y clasificada de alta capacidad hidrolítica, coincidiendo con Hernández (2006), en que los hongos tienen una alta capacidad hidrolítica. La respuesta de la cepa TH9 fue mejor que los obtenidos por Hernández (2012) ya que él reportó como

máximo (IP 1.03) en una de las cepas fúngicas estudiadas en medio agar-leche descremada.

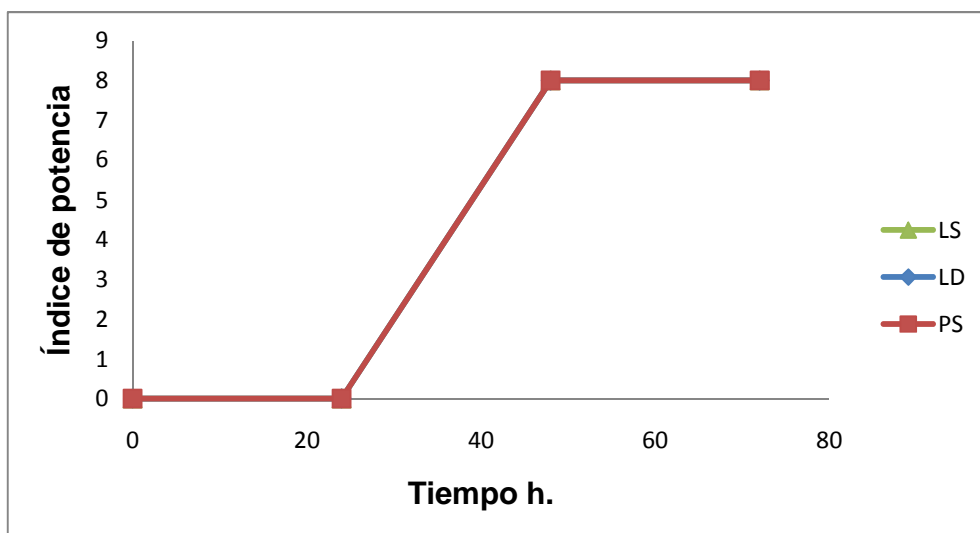


Figura 4.3 Cinética del índice de potencia respecto al tiempo en la cepa del género *Trichoderma harzianum* denominada TH9.

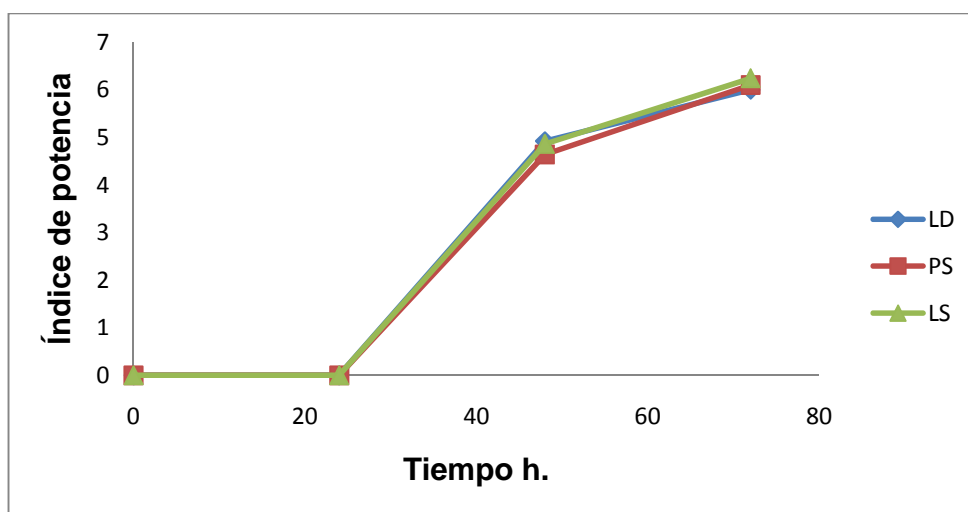


Figura 4.4 Cinética del índice de potencia respecto al tiempo en la cepa del género *Trichoderma harzianum* denominada TH.

Las cepas seleccionadas para la optimización del proceso de producción de proteasas con potencial de uso nematocida fueron las denominadas BSM (IP de 1.8 a las 48 h) y TH9 (IP de 8 a las 48 h) por mostrar mejores condiciones para la

inducción de la producción de proteasas y evaluando la factibilidad económica del proceso en el medio, se decidió seleccionar la proteína de suero por ser una proteína de bajo costo que contiene inductores de producción como subtilicina (Degering *et al.*, 2010).

4.2 Evaluación de la producción de proteasas a escala de laboratorio

4.2.1 Cinética para la cepa BSM

En la Figura 4.5, se muestra la respuesta en la producción de biomasa a través del tiempo, reflejando un aumento en la concentración de células por mL a partir de las 24 horas, manteniéndose este aumento hasta las 72 h, pero a las 96 y 120 h se logró observar una disminución, el cual está estrechamente relacionado con la velocidad de crecimiento de los microorganismos, distinguiendo las 4 fases de desarrollo, la fase logarítmica, exponencial, estacionaria y de muerte, coincidiendo con Sáez (2005), quien encontró un comportamiento de velocidad de crecimiento similar en *Bacillus sp.* alcalofílico.

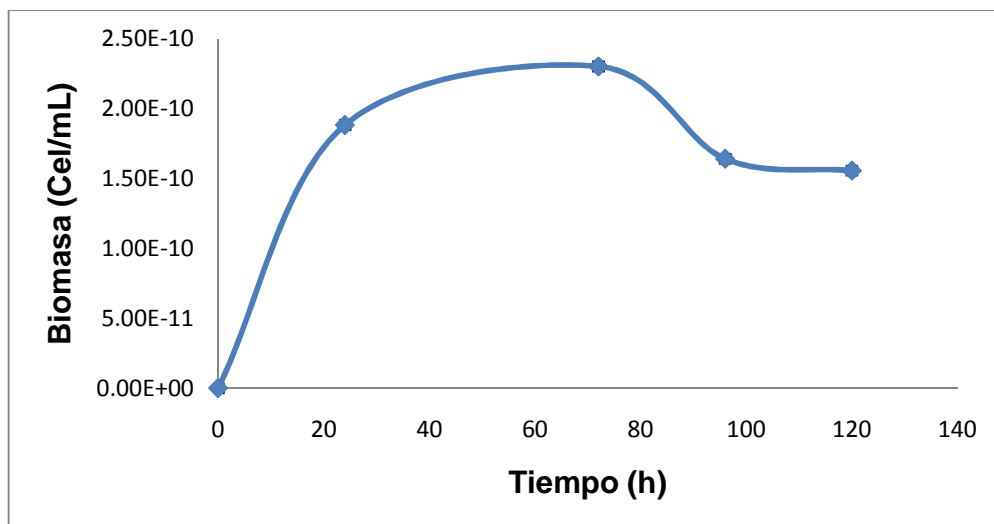


Figura 4.5 Producción de biomasa de la cepa *Bacillus licheniformis* (BSM) en medio de proteína de suero (PS) determinada mediante absorbancia a 560 nm (Basados en la relación de que el cambio de 0.1 de absorbancia es igual a 8×10^8 Cel/mL).

En la respuesta de producción de proteínas de BSM, se observó un valor de 1038.141 mg/L (1038 ppm) de proteína al tiempo cero, generando una disminución a las siguientes 24 h (955 mg/L), el cual persistió hasta las 96 h de crecimiento y alcanzó un ligero aumento a las 120 h con un valor de 1246 mg/L (1246 ppm) como se muestra en la Figura 4.6. Estos resultados muestran una diferencia superior a lo encontrado por Sáez (2003), donde los valores máximos (140 ppm) de producción de proteínas se encontraron a las 24 h en *Bacillus* spp. alcalofílico, esta diferencia es atribuida a la utilización de diferentes medios como sustrato, ya que en el presente estudio el abastecimiento de nutrientes o compuestos son de estructuras simples aún a pesar de ser de origen animal, en cambio el trabajo de Sáez utilizó un medio de licor de maíz fermentado, por lo que posiblemente no se encontraran los nutrientes en forma simple para el desarrollo de la bacteria, por tal razón la producción de la proteína fue menor.

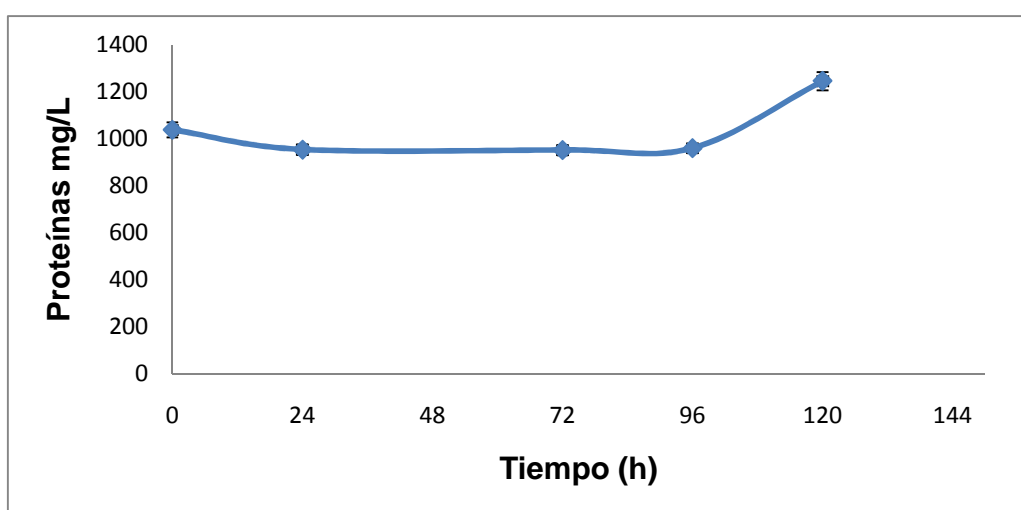


Figura 4.6 Concentración de proteínas de la cepa *Bacillus licheniformis* denominada (BSM), en medio de proteína de suero determinada mediante el método de Bradford.

Respecto a la concentración de azúcares totales presentes en la cinética de producción de proteasas por la cepa BSM en medio de proteína de suero, mostró un aumento exponencial hasta las 96 h (629.777mg/L), la cual a las 120 h presentó una disminución (Figura 4.7). Por los resultados obtenidos en la anterior variable y la

producción de azúcares, se observó que existe una relación entre el aumento de proteasa y disminución de azúcares, que por el mismo proceso metabólico de la bacteria es claro que consume los azúcares disponibles para la generación de la proteasa.

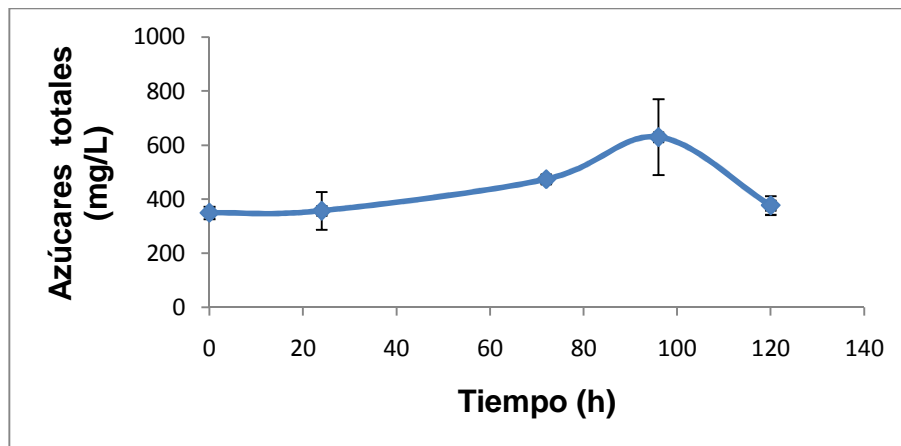


Figura 4.7 Concentración de azúcares totales en la producción de proteasas de la cepa *Bacillus licheniformis* denominada (BSM) determinada mediante el método de Fenol-Sulfúrico.

En la actividad enzimática de la cepa BSM se tuvo una máxima producción de 7 UT/mL a los 10 minutos, marcando una amplia posibilidad de optimizar el proceso para la producción industrial en múltiples usos, entre ellos en la agricultura, ya que tuvo una alta capacidad de producción de proteasa en un periodo de 120 h, sin embargo estos valores son superiores a los reportados Mendieta *et al.*, (2011) en donde reportó valores de 2.25 UT/mL a las 24 h, evaluando *Bacillus* spp. alcalofílico, por lo que la cepa BSM tiene amplias alternativas convenientes en explorar desde el punto de vista técnico económico, por tal motivo esto nos puede asegurar aun más el éxito de optimizar este proceso con BSM.

4.2.2 Cinéticas para la cepa TH9

Para el caso de la cepa TH9 se determinaron los mismos parámetros que en BSM para poder determinar en qué condiciones los microorganismos producen proteasas con actividad nematocida. En primer lugar se determinó la producción de biomasa

respecto al tiempo de incubación lo cual se puede observar en la Figura 4.8, que muestra una producción exponencial de biomasa hasta las 72 h. Este comportamiento está estrechamente relacionado con la velocidad de crecimiento de los microorganismos, donde se pueden distinguir 4 fases; La fase logarítmica, exponencial, estacionaria y la fase de muerte, por lo que la cepa TH9 muestra una velocidad de crecimiento normal.

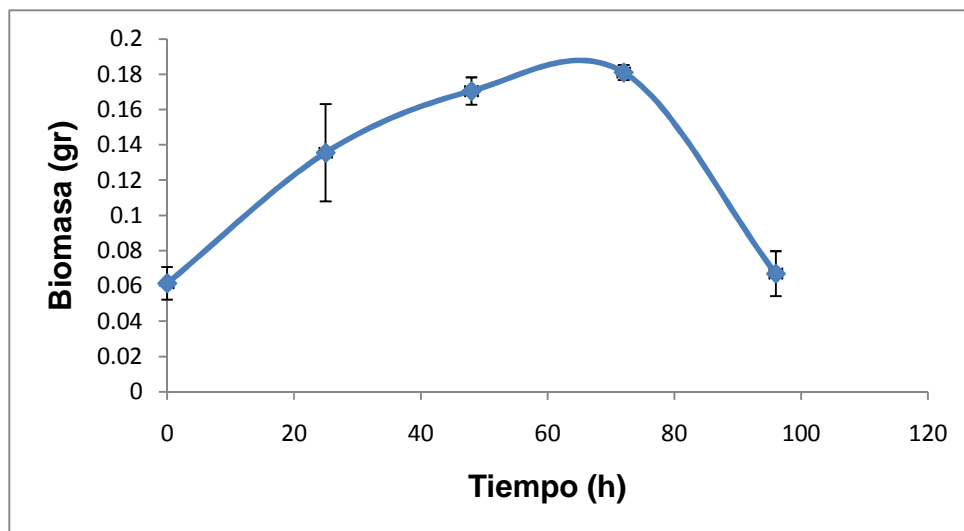


Figura 4.8 Producción de biomasa de la cepa *Trichoderma harzianum* denominada (TH9) en medio de proteína de suero determinada mediante el método de peso seco.

En cuanto a la concentración de proteína se concluyó que no hay aumento en la concentración de proteínas. Estos resultados son inferiores a los obtenidos por García *et al.*, (2011) quien obtuvo un valor máximo 550 mg/L a las 120 h, en *Metarhizium spp.*, en un cultivo sólido sobre espuma de poliuretano como soporte. Esta variación pudo deberse a que a los nutrientes en el medio de espuma de poliuretano se encontraban de forma aun más simple que el medio PS.

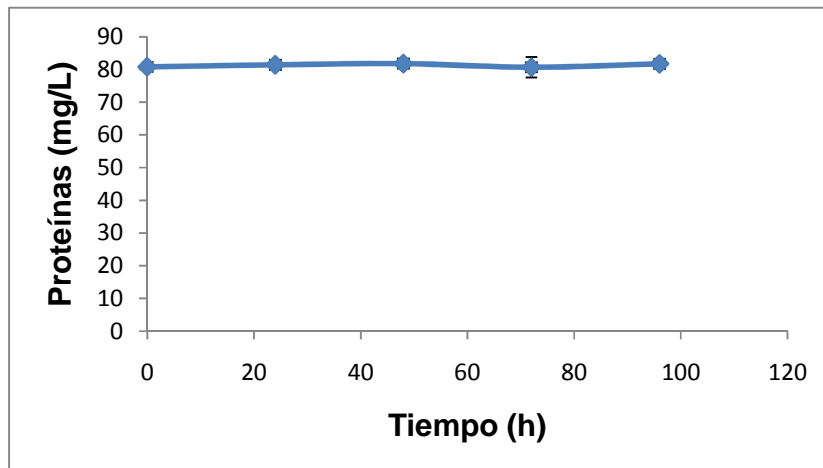


Figura 4.9 Concentración de proteínas de la cepa *Trichoderma harzianum* denominada (TH9) en la producción de proteasas en medio de proteína de suero determinada mediante el método de Bradford.

El comportamiento de la concentración de azúcares totales respecto al tiempo de incubación fue de una disminución exponencial, teniendo su valor máximo a las 0 h (1059.00 mg/L) y a las 96 su valor mínimo (267 mg/L). (Figura 4.10). Por los resultados obtenidos en la anterior variable y la producción de azúcares, se observó que existe una relación entre el aumento de proteasa y disminución de azúcares, que por el mismo proceso metabólico del hongo es claro que consume los azúcares disponibles para la generación de la proteasa.

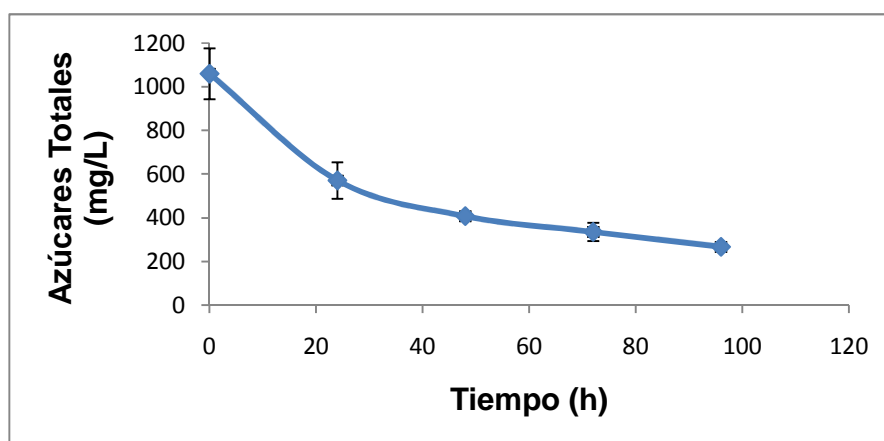


Figura 4.10 Concentración de azúcares totales en la producción de proteasas de la cepa *Trichoderma harzianum* (TH9) determinada mediante el método de Fenol-Sulfúrico.

En la determinación de actividad enzimática se obtuvo una producción máxima de 63.1 UT/ml a los 10 minutos, superando a los obtenidos en el reporte de Gregorio *et al.*, (2009), en donde la máxima actividad se presenta a las 42 horas (25 UT/mL) a partir de una cepa de *Trichoderma* spp. 12B, lo que da como conclusión que la producción de proteasas por la cepa TH9 tiene amplias posibilidades de aplicación práctica ya que tiene una alta capacidad de producción de proteasas en un periodo de 96 h, en donde se puede optimizar el proceso para la producción industrial en múltiples usos entre ellos un uso potencial en la agricultura moderna.

4.3 Evaluación de la efectividad biológica *in vitro* de los extractos de fermentación como nematocida.

En el análisis de varianza para la variable mortandad de nemátodos por la aplicación de los metabolitos resultantes de TH9 y BSM a diferente concentración, mostró una alta diferencia significativa entre los tratamientos, concentraciones y la interacción tratamiento por concentración (Cuadro 4.1), lo cual nos indica que existe al menos un tratamiento en una concentración que difiere en la respuesta de los demás, teniendo un coeficiente de variación de 21.5%.

Cuadro 4.1 Cuadros medios y significancia en variable de mortandad de nemátodos con la aplicación de tratamientos y concentraciones de metabolitos a base de TH9 y BSM.

	Grados de libertad	Cuadrados Medios	Valor F	Pr(>F)
Tratamiento	3	13374.6**	104.5098	<2.2e-16
Concentración	3	2182.6**	17.0553	8.513e-07
Tratamiento*Concentración	9	951.8**	7.4372	8.974e-06
Residuales	32	128.0		

Coeficiente de variación= 21.5%; significancia ** al 0.05%

Con respecto a la prueba de comparación de medias entre los tratamientos aplicados, se encontraron tres grupos estadísticos, donde el tratamiento 1 y 2

(metabolitos de TH9 y BSM) formaron el primer grupo con el mayor porcentaje de mortalidad arriba del 76 %, siendo los mejores en tener actividad nematicida, mientras que los tratamientos 3 y 4 mostraron un menor porcentaje de mortandad como se esperaba (Cuadro 4.2), debido a que los tratamientos 3 y 4 fue el medio de cultivo de TH9 y BSM utilizado como testigo en este estudio. Obteniéndose como resultado que el tratamiento 1 y 2 presentan alta actividad nematicida comparada con el testigo.

Cuadro 4.2 Comparación de medias variable de mortandad de nemátodos con la aplicación de tratamientos de metabolitos a base de TH9 y BSM.

Tratamiento	% Mortalidad ±SE	Grupo estadístico
T1	75.8 ± 5.42	A
T2	84.3 ± 3.79	A
T3	36.1 ± 9.14	B
T4	13.6 ± 4.25	C

En el caso de las concentraciones evaluadas, se pudo observar en la prueba de comparación de medias que la mejor concentración para la aplicación de los metabolitos fue la de 5% con una media del 71% de 12 repeticiones seguida del 2% con una media del 52 % como se muestra en el Cuadro 4.3, lo cual indica que a concentraciones altas se pueden obtener mejores resultados en la efectividad de estos metabolitos de bacterias como de hongos.

Cuadro 4.3 Comparación de medias variable de mortandad de nemátodos con la aplicación de concentraciones de metabolitos a base de TH9 y BSM.

Concentración	Mortalidad %±SE	Grupoestadístico
0.5%	40.8 ± 9.83	B
1%	44.9 ± 11.9	B
2%	52.9 ± 7.54	B
5%	71.2 ± 10.1	A

En la respuesta de mortalidad de nemátodos en la interacción de tratamientos y concentraciones de metabolitos a base de TH9 y BSM (Cuadro 4.4), se observó que los mejores tratamientos fueron el 1 y 2 a una concentración de 5%, donde *B. licheniformis* (BSM) indujo mortalidad del 100% y *T. harzianum* (TH9) el 93%; así mismo el estudio indicó que el tratamiento 1 a una concentración de 1% mostró efectividad con 84% de mortalidad, mientras que el tratamiento 2 mostró valores superiores al 80% a concentraciones de 1 y 2 %. Estos resultados son superiores a los reportados por Márquez *et al.*, (2004) donde obtienen un 66% de control del nemátodo agallador en vivo.

Cuadro 4.4 Comparación múltiple de medias analizando la interacción tratamiento y concentración

Tratamiento	Concentración	Mortalidad	Repetición	Grupo
T2	5%	100%	3	A
T1	5%	93.3%	3	A
T1	1%	84%	3	Ab
T2	2%	83%	3	Ab
T2	1%	82.5%	3	Ab
T3	5%	75.1%	3	Ab
T1	0.5%	74.2%	3	Ab
T2	0.5%	72%	3	Ab
T3	2%	54%	3	Bc
T1	2%	52%	3	Bc
T4	2%	22.7%	3	Bc
T4	5%	16.6%	3	Bc
T4	0.5%	12.5%	3	Bc
T3	1%	10.7%	3	Bc
T3	0.5%	4.6%	3	Bc
T4	1%	2.5 %	3	Bc

4.4 Purificación de proteasas mediante FPLC utilizando una columna de sephadex G-25.

Se realizaron análisis de purificación de proteasas de las cepas de TH9 en medios PS, Th (medio para hongos) y BSM en medios PS yT8 (medio para *Bacillus* spp)

obteniéndose un promedio de 2 corridas con 13 fracciones aproximadamente en cada uno de los microorganismos en el medio utilizado, una vez obtenidos las corridas y los cromatogramas se procedió a realizar la cuantificación de la concentración de proteínas.

En la Figura 4.11 se muestra el comportamiento de la concentración de las proteínas en cada una de las fracciones. Las fracciones que presentan mayor concentración son la 1 (210.208 mg/ml), 2 (241.666 mg/mL) y 4 (256.666 mg/mL) en la cepa TH9 en medio PS. Estos resultados muestran similitud con los reportados por Niu (2006), donde purifican una proteína obtenida a partir de *Bacillus nematocida* donde obtuvo una concentración de 239mg/mL.

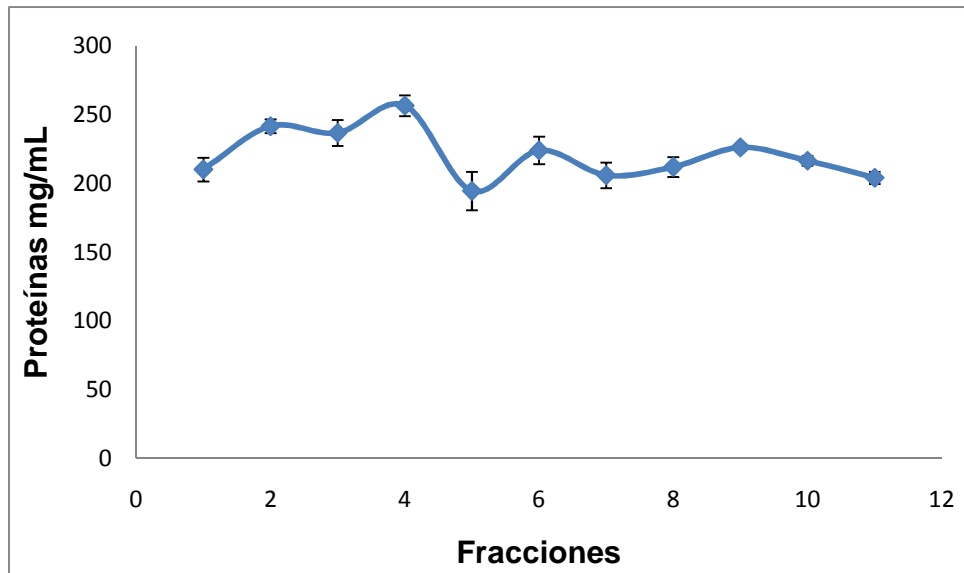


Figura 4.11 Concentración de proteínas de la cepa *Trichoderma harzianum* (TH9) en medio PS (Proteína de suero) en cada una de las fracciones.

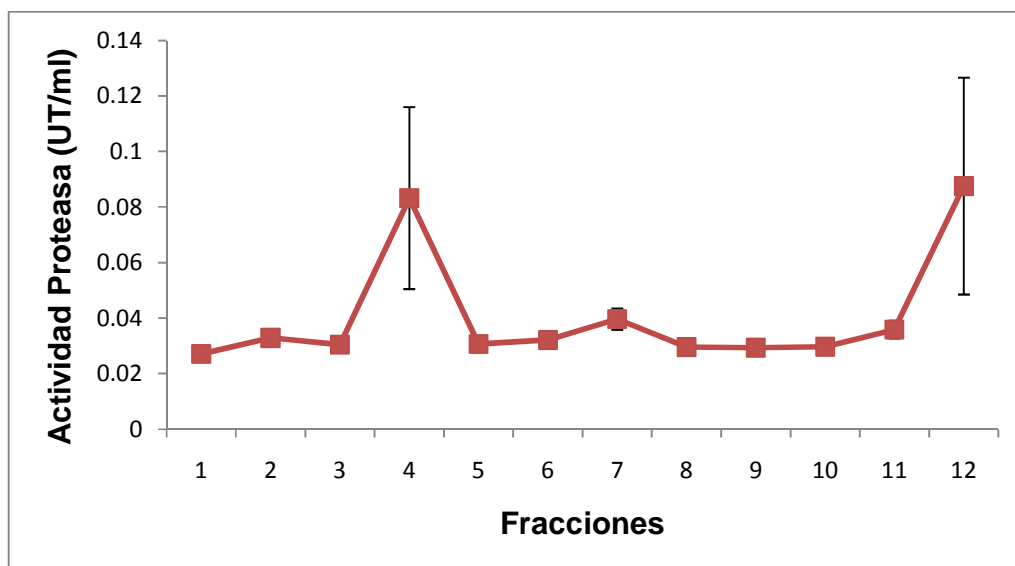


Figura 4.12 Actividad enzimática de la cepa *Trichoderma harzianum* (TH9) en medio PS (Proteína de suero) en cada una de las fracciones

En la actividad enzimática (Figura 4.12) se muestran dos picos en la fracción 4 y 12 lo cual indica que es donde se encuentran las proteínas con actividad proteolítica, la fracción 4 de la figura 4.11 coincide con el pico de la fracción 4 de la Figura 4.12, quedando así más claro que en esta fracción es donde se encuentran proteínas con actividad proteolítica. La fracción 12 de la concentración de proteínas (Figura 4.11) no se relaciona directamente con la actividad enzimática de la fracción 12 de la Figura 4.12, debido a las posibles isoformas (distintas formas en que se puede presentar una proteína (Adriana, 2005)) que se pudieron haber presentado, influido por factores como el tipo de medio utilizado en este estudio, o por la temperatura a la que se encubaron las muestras para el análisis.

En la fracción 3 (210.468 mg/mL), 4 (210.312 mg/mL), 9 (209.687 mg/mL), y 13 (213.593 mg/mL), de la Figura 4.13 se encontró la mayor producción de proteínas, siendo estos valores superiores a los reportados por Niu (2006) donde su máxima concentración fue 80 mg/mL trabajando con *Bacillus nematocida*.

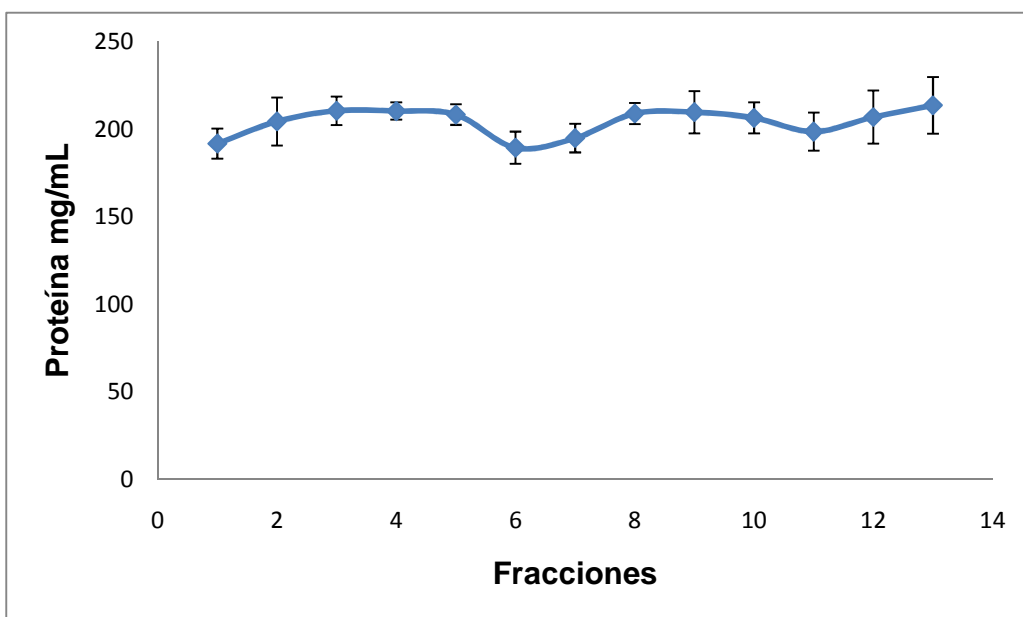


Figura 4.13 Concentración de proteínas de la cepa *Bacillus licheniformis* (BSM) en medio PS (proteína de suero) en cada una de las fracciones.

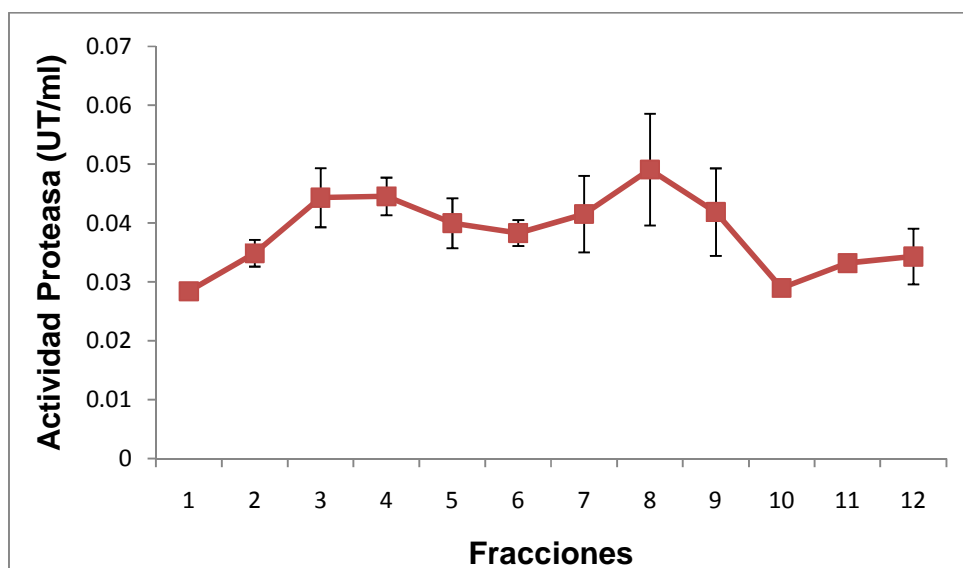


Figura 4.14 Actividad enzimática de la cepa *Bacillus licheniformis* (BSM) en medio PS (proteína de suero) en cada una de las fracciones.

En esta actividad enzimática (Figura 4.14) se muestra que las fracciones 3 (0.044 UT/mL) y 8 (0.049 UT/mL) se encuentran proteínas con mayor actividad proteolítica. La concentración de proteínas (Figura 4.13) no se relaciona directamente con la

actividad enzimática de la Figura 4.14, debido a las posibles isoformas (distintas formas en que se puede presentar una proteína (Adriana, 2005)) que se pudieron haber presentado, donde influyeron factores como el tipo de medio utilizado en este estudio, o por la temperatura a la que se encubaron las muestras para el análisis

En la Figura 4.15 la fracción 8 fue la que obtuvo la mayor concentración de proteínas (266.666mg/mL). Estos resultados son superiores a los reportados por Niu *et al.*, (2006) obteniendo una concentración de 160 mg/mL, estas diferencias en la comparación de los resultados se deben al tipo de medio utilizado en cada experimento para la inducción de la producción de metabolitos por TH9, donde esta cepa tiene una alta capacidad de procesar el medio utilizado como sustrato y generar una alta concentración de proteína.

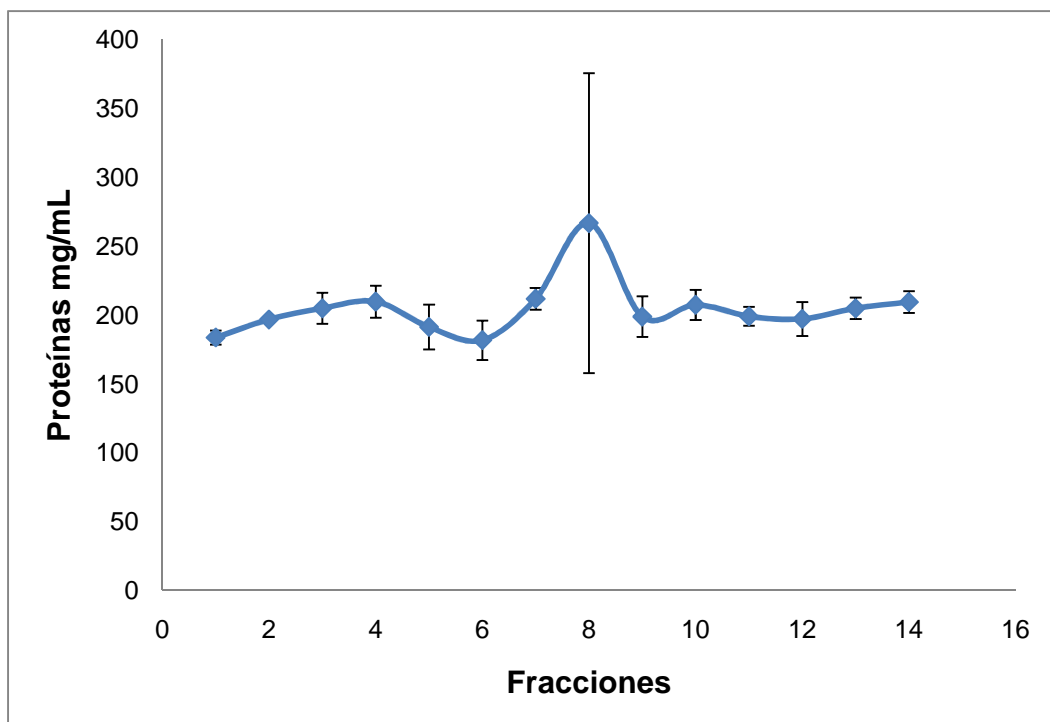


Figura 4.15 Concentración de proteínas de la cepa *Trichoderma harzianum* (TH9) en un medio de Th (medio para hongos) en cada una de las fracciones.

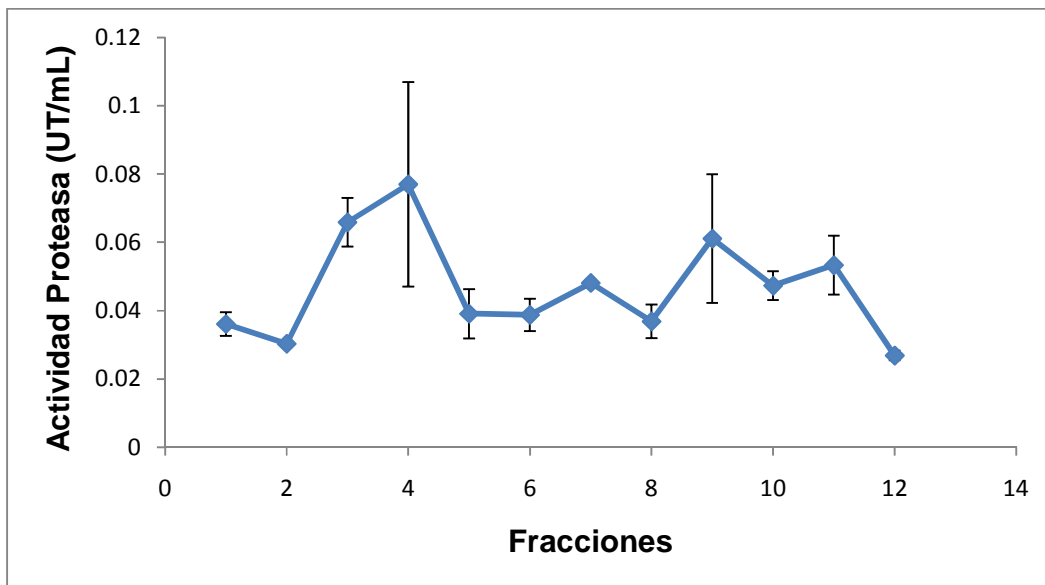


Figura 4.16 Actividad enzimática de la cepa *Trichoderma harzianum* (TH9) en un medio de Th (medio para hongos) en cada una de las fracciones.

En la actividad enzimática (Figura 4.16), se muestra un solo pico en la fracción 4 (0.077 UT/mL), donde se encuentran proteínas con actividad proteolítica. La concentración de proteínas (Figura 4.15) no se relaciona directamente con la actividad enzimática de la Figura 4.16, debido a las posibles isoformas (distintas formas en que se puede presentar una proteína (Adriana mira, 2005)) que se presentaron, algunos de los factores que influyeron fue el tipo de medio utilizado en este estudio, o por la temperatura a la que se encubaron las muestras.

En la Figura 4.17 se observa la mayor producción de proteínas en la fracción 2 de la cepa BSM con 270.416 mg/mL, pero aun así la concentración de proteínas es menor que la reportada por Márquez *et al.*, (2003) donde obtuvo una concentración de 360 mg/mL en *Bacillus subtilis*, esta diferencia de concentración en estos estudios se debe al tipo de sustrato utilizado para la inducción de la proteasa ya que el medio para la inducción de proteasa en la cepa *Bacillus subtilis* fue Agar Nutriente (AN) (Oxoid CM3) a una temperatura de 10°C, en donde los nutrientes se encontraban de manera más simple que el medio T8 (medio para *Bacillus subtilis*).

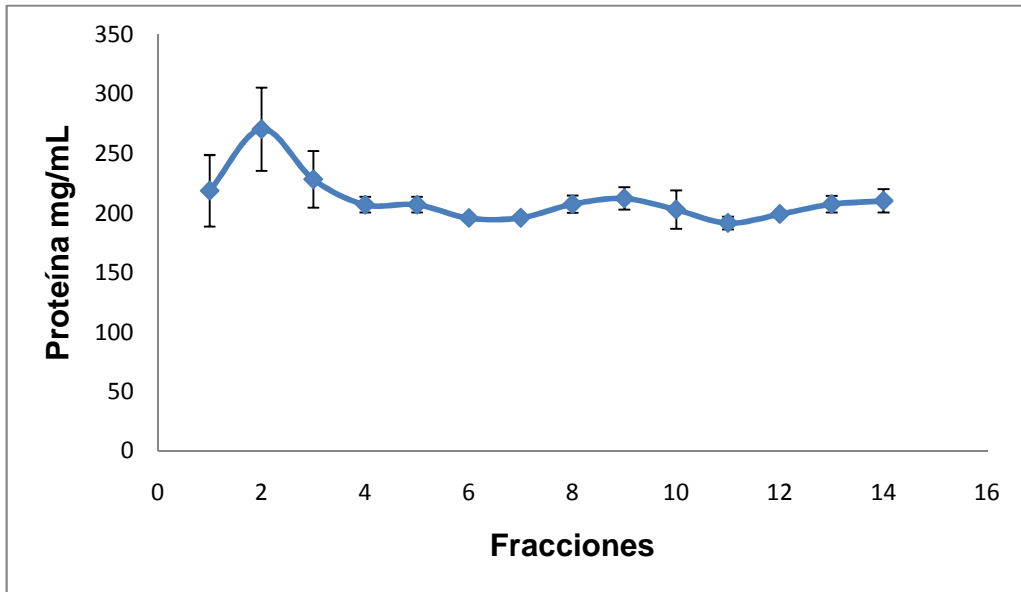


Figura 4.17 Concentración de proteínas de la cepa *Bacillus licheniformis* (BSM) en medio T8 (medio para bacterias) en cada una de las fracciones.

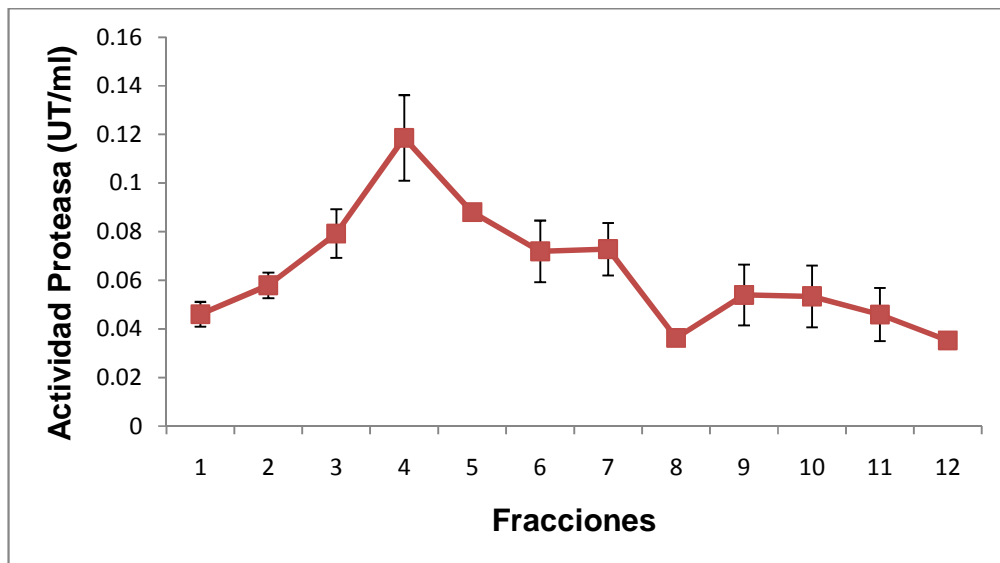


Figura 4.18 Actividad enzimática de la cepa *Bacillus licheniformis* (BSM) en medio T8 (medio para bacterias) en cada una de las fracciones.

En esta actividad enzimática (Figura 4.18) se muestra un pico en la fracción 4 (0.118 mg/mL) en esta fracción es donde se encuentra la mayor actividad proteolítica, siendo una proteína de alto peso molecular, lo cual indica que es donde se encuentra la mayor concentración de proteínas. La concentración de proteínas (Figura 4.17) no

se relaciona directamente con la actividad enzimática de la Figura 4.18, debido a la presencia de las posibles isoformas (distintas formas en que se puede presentar una proteína (Adriana, 2005)) que se presentaron, inducida por varios factores como las diferentes temperaturas de incubación a la que se sometió la muestra o por el medio utilizado.

5. CONCLUSIONES

Una vez generados los resultados de los estudios se llegó a las siguientes conclusiones:

Las cepas de los cuatro microorganismos estudiados (BSM, BSJ, TH9 y TH) que presentaron mayor capacidad proteolítica fueron las denominadas BSM y TH9 en medio PS. Las cepas BSM y TH9 tienen amplia capacidad de optimizar el proceso en la producción de proteasas para la producción industrial, con amplias aplicaciones entre ellos en la agricultura.

La fracción que mostro mayor actividad enzimática fueron los metabolitos de la cepa *Trichoderma harzianum* (TH9) en medio PS (Proteína de suero), en la fracción 4 con un valor de 0.0832 UT/mL, siendo esta proteasa de alto peso molecular. La segunda fracción que presento mayor actividad enzimática fueron los metabolitos de la cepa *Bacillus licheniformis* (BSM) en medio PS (proteína de suero) en la fracción 8 con un valor de 0.0491 UT/mL, donde esta proteasa es de mediano peso molecular.

Los mejores tratamientos con actividad nematocida fueron el 1 (*Trichoderma harzianum* (TH9) con el 93% de mortalidad) y 2 (Metabolitos *Bacillus licheniformis* (BSM) con el 100% de mortalidad) a una concentración de 5%.

5.1 PERSPECTIVAS

Este estudio es parte de un proyecto que tiene como objetivo principal el desarrollar un producto orgánico para control problemas importantes de nemátodos fitoparásitos.

En base a los resultados obtenidos se puede afirmar que existe gran potencial de utilizar metabolitos obtenidos mediante procesos biotecnológicos en este caso mediante fermentación sumergida para controlar este tipo de organismos, que ocasionan grandes problemas en la agricultura y por lo tanto desabasto en alimentos.

6. LITERATURA CITADA

- Abad P., Favery, B., Rosso M. y Castagnone-Sereno P. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*. 4 (4), 217–224.
- Adriana Mira Ruth. 2005. Síndrome de ovario poliquístico – Teorías de su fisiopatología. *Rev. Bioquímica y patología clínica*. Volumen 69. Numero 002.
- Agrios G.N. 1998. *Fitopatología*, 3era Edición, México, 838 pp.
- Almeida-Engler, J., Vleesschauwer, V., Burssens, S., Celenza, J., Inzé, D., Van Montagu., Engler, G., y Gheysen, G. 1999. Molecular Markers and Cell Cycle Inhibitors Show the Importance of Cell Cycle Progression in Nematode-Induced Galls and Syncytia. *Society of Plant Physiologists*. 11: 793–807.
- Alquicira Paez Lizbeth. 2003. Determinación de la especificidad de proteasas fúngicas en la hidrólisis de proteínas.
- Arauz Cavallini Luis Felipe. 1998. *Fitopatología. Un enfoque agroecológico*. SAN JOSE.
- Arias Yailén, González Ivonne, Rodríguez Mayra, Rosales Carolina, Suárez Zoraida, Peteira Belkis. 2009. Aspectos generales de la interacción tomate (*Solanum lycopersicon L.*), (*Meloidogyne incognita*). *Rev. Protección Veg.* V.24 N.1

- Bello, J. A., López-Pérez, A., García Álvarez. 2003. Biofumigación en Agricultura Extensiva de Regadío: Producción Integrada de Hortícolas. Mundi-Prensa Libros.
- Berkelaar, E. 2002. Métodos de Manejo de Nematodos. Echo notas de desarrollo. 75: 1-6.
- Braga, R., Labrada, R., Fornasari, L., y Fratini, N. 2003. Manual para la capacitación de trabajadores de extensión y agricultores: Alternativas al bromuro de metilo para la fumigación de los suelos. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Raimundo Braga.
- Brandan, Nora., Llanos, Cristina., Barrios, Belén Itatí., Escalante Marassi., Andrea P., Ruíz Díaz., Daniel A., N. 2008. Enzimas. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de medicina. Cátedra de bioquímica.
- Cano Enilda., Carballo Manuel., Guharay Falguni., López José Antonio. 2004 Control biológico de plagas agrícolas. Centro agronómico tropical de investigadores y enseñanza.
- Carlier Jean., Dirt De Waele., Escalant Jean-Vincent. 2002. Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por Fusarium, enfermedades de las manchas foliares causadas por Mycosphaerella y nemátodos. Guías técnicas INIBAP No. 7.
- Carrillo Rayas María Teresa., Blanco Labra Alejandro. 2009. Potencial y Algunos de los mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. Redalyc. pp. 40-49.
- Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes. Euphytica. 124(2): 193-199.

- Chandravanu Dash., Mala Raos. 2003. Interactions of a novel inhibitor from an extremophilic *Bacillus* spp. With HIV-1 protease. The journal of biological chemistry. Pag. 2487-2493.
- Chromatography, Theories, FPLC and beyond.
- Cid del Prado V.I., Tovar Soto A., Alfonsina Hernández J. 2001. Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en México. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 19, numero 001. pp. 32-39.
- Cid del Prado, V.I., Hernández, J.A., Espinoza, T.V., Tovar, S.A. y Torres, C.R. 1997. Distribución geográfica y frecuencia de especies y razas de *Meloidogyne* en la República Mexicana. XXIX Annual Meeting of the Organization of Tropical American Nematologists. Cancún, México, p. 59.
- Decraemer, W. y Hunt, D. 2006. Taxonomy and Principal Genera. Structure and classification. En: Plant Nematology. CAB International, Wallingford, UK. Part I, Chapter. 1: 3-32.
- Díaz Viruliche L. 2001. Interés fitotécnico de la biofumigación en los suelos cultivados. E.T.S. De ingenieros agrónomos.
- Duncan, L. 1991. Current options for nematode management. Annu. Rev. Phytopathologi. 29: 469-490.
- En: Plant Nematode Problems and their Control in the Near East Region. FAO Plant Production and Protection Paper, 144 (Maqbool, M. A. y Kerry, B. R.Eds). 1997. <http://www.fao.org/docrep/V9978E/v9978e00.htm#Contents>.
- Espitia Miguel., Petro María., Padilla Lobo., Romero Peña. 2012. Aislamiento de la bacteria (*B. licheniformis*). Universidad de Córdoba.

- Fenoll, C. y del Campo, F. F. 1998. The molecular basis of nematode endoparasitism in plants. *Physiology Molecular Biology Plants*. (4): 9-18.
- Fenoll, C., Aristizabal, F. A., Sanz-Alferez, S. y del Campo, F. F. 1997. Regulation of gene expression in feeding sites. En: *Cellular and Molecular Aspects of Plant–Nematode Interactions*. Kluwer Academic. pp. 133–149.
- Fernández, E., Bernal B y Vázquez, L. 1996. Manejo Integrado de Plagas en los Organopónicos. *Boletín Técnico de Sanidad Vegetal*. 2(3): 1-42.
- Fernández, E., Lovaina, A., y Cuadra, R. 2004. Pest management in Urban Agriculture Systems: A case study with plant-parasitic nematodes. En: XXXVI Annual Meeting of ONTA. pp. (58) 4-8.
- Fernández, E., Pérez, M., Gandarilla, H., Vázquez, R., Fernández, M., Peneque, M., Acosta, O., Basterrechea, M. y Cuadra, R. 1998. Guía para disminuir infestaciones de *Meloidogyne* spp., mediante el empleo de cultivos no susceptibles. *Boletín Técnico. Sanidad Vegetal*. 4(4): 1-18.
- Fernández-Reyes y Galván Cejudo. Métodos para la cuantificación de proteínas. Consultado en noviembre del 2012.
- Franco Vera Luis. 2007. Enzimas: qué son y para qué sirven. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)*. Vol. 101, Nº. 2, pp 399-417.
- García G., Huerta-Ochoa., Loera-Corral., Prado-Barragán. Selección de cepas fúngicas productoras de proteasas. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Departamento de biotecnología. Consultado, noviembre del 2012.
- García-Galindo Ivonne., Amaya-Rivera Ismael., Gallegos-Morales Gabriel., Rodríguez Herrera Raúl y Noé Aguilar Cristóbal. 2011. Análisis de hidrolasas de *Metarhizium anisopliae* en cultivo solido sobre espuma de

poliuretano como soporte. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila.

- Gheysen, G. y Fenoll, C. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Ann. Rev. Phytopathol.* 40: 191-219.
- Gheysen, G. y Jones, J. 2006. Nematode Biology and Plant Responses. *Molecular Aspects of Plant Nematode Interactions*. En: *Plant Nematology* (Perry, R. y Moens, M. Eds). CAB International, Wallingford, UK. Part II, Chapter 9: 234-252.
- Gómez S., Álvarez F., Fraga V., Reyes F., Hernández B., Lemes R., San Juan R. 2004. Metabolitos producidos por el hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*. *Biotecnología Aplicada*. 21:92-95.
- Gómez, E., Rodríguez, A. N., San Juan, T., Lemes, J. Hernández., Guevara, L., Labrada, A. Hernández. 2010. Efecto del Nematicid sobre *Meloidogyne incognita* y los componentes del suelo. *Redalyc*. pp. 48-72
- Gonzales Luis Carlos. 1989. Introducción a la fitopatología. Orton IICA/CATIE
- Gowen, S. R. Chemical control of nematodes: efficiency and side-effects. (Proceedings of the Expert Consultation on Plant Nematode Problems and their Control in the Near East Region Karachi, Pakistan 22-26).
- Gregorio-Jáuregui Karla M., Cano-Cabrera J.C., Segura-Ceniceros E.P., Martínez-Hernández J.L. 2009. Desarrollo de una pre-formulación de aerosol de pectina-papaina para el tratamiento de lesiones cutáneas. *Rev. A.Q.M.*
- Guadix, A., Guadix, E., Páez Dueñas, M., González Tello, P. y col. 2000. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. 41:1; 79-89.

- Hernández M., Carvajal C., Márquez M., Baez R., Morris H., Santos R., Chávez M. 2005. Obtención de preparados enzimáticos a partir de tallos de piña (*Ananas comosus*) con potencialidad de uso en la biotecnología y la medicina. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 36.
- Hernández Martínez R. 2006. Producción y caracterización de un extracto proteolítico termoestable. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.
- Hernández Martínez. 2006. Producción y caracterización de un extracto proteolítico termoestable. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
- Hernández R., Huerta S., Regalado C., Loera O. y Prado L. Selección de una cepa fúngica termotolerante productora de proteasas termoestables. Consultado Noviembre del 2012
- Hernández-Martínez R. 2006. Producción y caracterización de un extracto proteolítico termoestable. Tesis nivel maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.
- Hidalgo Oscar A., Rincón R, Hernán. 1990. Avances en el mejoramiento genético de la papa en los países del Cono Sur. Centro internacional de la papa.
- http://web.mnstate.edu/biotech/chrom_fplc.pdf
- <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf>

- Hunt, D., Luc, M. y Manzanilla-López, R. 2005. Identification, Morphology and Biology of Plant Parasitic Nematodes. En: Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture (Luc, M., Sikora, R. A. y Bridge, J. Eds). CAB International, Wallingford, UK. Capítulo 2: 11-52.
- Introducción a la nematología agrícola. 2008. http://mie.esab.upc.es/nematologos/docu/Manual_Web2.pdf
- Josep Jacas., Primitivo Caballero J.Á. 2005. 3ra edición. El control biológico de plagas y enfermedades. Medi Ambient 5.
- Jung Christian., Daguang Cai., Kleine Michael. 1998. Engineering nematode resistance in crop species Review Article. Trends in Plant Science, Volumen 3. Pages 266-271.
- Karssen, G. y Moens, M. 2006. Taxonomy and Principal Genera. Root-Knot Nematodes. En: Plant Nematology (Perry, R. y Moens, M. Eds). CAB International, Wallingford, UK. Part I, Chapter 3: 60-90.
- Keen, N. T. y Roberts, P. A. 1998. Plant parasitic nematodes: Digesting a page from the microbe book. Proc.Natl. Acad.Sci. 95: 4789-4790.
- Labrada, R. y Fornasari, L. 2001. Global Report on Validated Alternatives to the Use of Methyl Bromide for Soil Fumigation. FAO- UNEP. pp 17-24.
- Lambert, K. y Bekal, S. 2002. Introduction to Plant-Parasitic Nematodes. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-1218-01.
- Lamberti, F. 1997. Plant Nematology in developing countries: Problems and Progress. (Proceedings of the Expert Consultation on Plant Nematode Problems and their Control in the Near East Region Karachi, Pakistan 22-26 November 1992). En Plant Nematode Problems and their Control in the Near

East Region. FAO Plant Production and Protection Paper, 144 (Maqbool, M. A. y Kerry, B. R. Eds).

- Lehninger, L. Albert. 1993. Principios de Bioquímica. 2ª Edición. Editorial Omega. pp. 196 – 237.
- Márquez Gutiérrez, María E., Torres Sánchez, Luis Arístides., Escobar Hernández. 2003. Evaluación del efecto nematicida de cepas de Bacillus spp. Redalyc. pp 55-58
- Márquez, María E., Garmendía, Leonor., Fernández, Emilio., Escobar Hernández. 2004. Cepas de Bacillus thuringiensis con actividad biológica contra Meloidogyne incognita. Redalyc. Fitosanidad, vol. 8, núm. 3, pp. 31-35
- Mendieta, Julieta R., Muñoz, Fernando F., Daleo, Gustavo R., Guevara, María G. 2011. Actividad citotóxica de staps (Solanumtuberosum ASPARTIC PROTEASES) sobre bacterias patógenas de humanos. Rev. Redalyc vol. 6, núm. 5, 2007, pp. 258-259
- Minnesota, Paul. 1988. Compendio de enfermedades de la Batata (camote, Boniato). The American Phytopathological Society.
- Nuez, R., Gil, O., Costa, J. 1996. El cultivo de pimiento, chiles y ajies. Mundi-Prensa Libros.
- Orzúa-González, C., Contreras-Esquivel J., Rodríguez-Herrera R. y Aguilar Cristóbal N. 2009. Tratamiento de residuos agroindustriales por fermentación fúngica en medio solido. Acta Química Mexicana.
- Parviz Jatala. 1986. Nematodos parásitos de la papa. CIP.
- Piedra Naranjo Ricardo. 2008. Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias. Tecnología en Marcha.Vol. 21-1. pp. 123-132.

- Pierre Abad. Valerie M., Williamson. 2010. Plant Nematode Interaction: A Sophisticated Dialogue. Elsevier Academic Press. Volumen 53 de Advances in botanical research.
- Pino Meléndez V. 2010. Efectos de extractos vegetales en la reducción poblacional de *Meloidogyne* spp; *Rotylenchulus reniformis* y *Pratylenchu* spp; en tomate (*Lycopersicon esculentum* mill). Tesis de nivel licenciatura. Universidad Técnica de Babahoyo. Facultad de ciencias agropecuarias. Babahoyo-Los ríos Ecuador.
- Qihong Niu., Xiaowei Huang., Lin Zhang y col. 2006. A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes. *Arch Microbiol.* 185: 439-448.
- Ramírez Cruz A. 2009. Producción de proteasas de *Mucor griseocyanus* en cultivo sumergido empleando diferentes fuentes de carbono. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias químicas.
- Razo Belmán M.R., Barboza Corona J.E., Salcedo Hernández R., y col. Producción de Proteasas y Bacteriocinas por la Cepa Mexicana *Bacillus subtilis* No. 21 Contra Hongos y Bacterias Patógenas en Alimentos. Departamento de Alimentos, Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato. Consultado en el 2012
- Resúmenes del II Taller Latinoamericano de Biocontrol de Fitopatógenos. 2010. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal Cuba. *Redalyc. Fitosanidad.* Vol. 14. Núm. 1. pp. 48-72.
- Rivera Coto G. 1999. Conceptos introductorios a la fitopatología. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José Costa Rica.

- Rodríguez-Rodríguez. R., Tabares Rodríguez. J. A., Medina san Juan. 1984. Cultivo moderno del tomate. Mundi-Prensa Libros.
- Rojas, T. 2003. Análisis económico sobre diferentes alternativas de combate a nematodos en el cultivo de arroz (*Oryza sativa*). Alcances Tecnológicos. Rev. del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en tecnología agropecuaria. 1 (1): 21-24.
- Romero-Arenas O., Huerta-Lara M., Damián-Huato M., y col. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol.11. No.2.
- Robles-Hernández, J.P., Pérez-Moreno L. 2011. Densidad Poblacional de Nematodos Fitoparásitos en Suelo de Irapuato, Guanajuato. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 29. Núm. 2.
- Sáenz-Galindo A., Pérez-Berúmen C., Barajas Bermúdez L. y López-López LI. 2009. Enfoque de la química verde hacia la importancia del uso de catalizadores. Rev. Acta Química Mexicana. No. 1
- Sáez-Vega A. 2005. Proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus* spp. alcalofílico. Rev. Ingeniería y ciencia. Vol. 2. No. 003. pp. 29-38.
- Sáez-Vega A. 2007. Proteasa alcalina de una cepa nativa de *Bacillus* spp. alcalofílico. Universidad EAFIT-Medellín (Colombia).
- Sáez-vega A., Montoya Olga., Judith Márquez E. 2004. Efecto de la aflatoxina B1 sobre el crecimiento y actividad proteolítica de una cepa nativa de *Bacillus* sp. Revista colombiana de biotecnología. Pág. 55-57.
- San Juan A., Álvarez Rosa M., Gómez Eulalia., Lemes Teresita. y Hernández Joel. 2008. Estudio de concentración de proteasas alcalinas por ultrafiltración

ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Redalyc. Vol. XLII. Núm. 1-3. pp. 90-95.

- Sanz-Alfárez, S., Uribe, X., Aristizábal, F. A., Herreros, E., Del Campo, F. F. y Fenoll, C. 2000. Cis-Elements In Nematode-Responsive Promoters. El SEVIER SCIENCE. Volumen 6. Pages 177-182.
- Sirca, S., Urek, G. y Karssen, G. 2004. The incidence of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* in Slovenia. *Acta Agriculturae Slovenica*. pp 15-22.
- Stirling, G. R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, Problems and Prospects. CAB. International, Wallingford. pp 235-274.
- Talavera Miguel. 2003. Introducción a la Nematología Agrícola. http://www.academia.edu/172270/Introduccion_a_la_Nematologia_Agricola
- Tamayo M., Pablo J. 2001. Principales enfermedades del tomate de árbol, la mora y el lulu en Colombia. Corpoica. Boletín técnico 12.
- Trudgill, D. L., y Blok, V. C. 2001. Apomictic polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39: 53-77.
- Valencia-Guerrero M., Quevedo-Hidalgo B., Franco-Correa, M., Díez-Ortega H., y col. 2011. Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium* spp., aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. *Universitas Scientiarum*.
- Vázquez-Imir, R., Aguilera-Antonio, F., Prado-Barragán, L., Aguilar Cristóbal, N. 2008. Producción Fúngica de Proteasas Inducidas con Pelo de Cerdo. *Información Tecnológica*. Vol. 19(2), 33-40.

- Widmer, T. L., Mitkowski, N. A, y Abawi G. S. 2002. Soil Organic Matter and Management of Plant-Parasitic Nematodes. *Journal of Nematology*. 34(4): 289–295.
- Williams, C., Lee, C., Garlich, J., Shih, J. 1991. Evaluation of a bacterial feather-lysate, as a feed protein. *Poult. Sci.* 70: 85-94.
- Williamson, V. M. y Gleason, C. A. 2003. Plant-nematode interactions. ELSEVIER. 6: 1-7
- Wright, D. y Perry, R. 2006. Nematode Biology and Plant Responses. Reproduction, Physiology and Biochemistry. CAB International, Wallingford, UK. Part II, Chapter 7: 188-207.
- Wyss, U., Grundler, F. M. W. y Munch, A. 1992. The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica*, 38: 98-111.
- Yang J., Tian B., Liang L., Zhang K.Q. 2007. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 21-31.