

## Microorganismos Benéficos Asociados a *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en Guayabo (*Psidium guajava* L.) de Calvillo, Aguascalientes, México

### *Beneficent Microorganisms Associated to Meloidogyne incognita (Kofoid & White) Chitwood in Guava (Psidium guajava L.) of Calvillo, Aguascalientes, México*

**Gabriel Gallegos-Morales, Melchor Cepeda-Siller, Francisco Daniel Hernández-Castillo**, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología Agrícola, Buenavista, Saltillo, Coahuila CP 25315; **Ana María Acosta-Zamarripa**, SAGARPA, Sanidad Vegetal, Av. Convención de 1914 No. 2202, Colonia Buenos Aires, Aguascalientes, Ags. CP 20020; **Rodolfo Velásquez-Valle, Ernesto González-Gaona**. INIFAP, Campo Experimental Pabellón, Apdo. Postal No. 20, Pabellón de Arteaga, Aguascalientes CP 20660; **Juan Manuel Sánchez-Yáñez**. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacan, CP 58000. Correspondencia: ggalmor@uaaan.mx

(Recibido: Noviembre 27, 2001 Aceptado: Septiembre 27, 2007)

Gallegos-Morales, G., Cepeda-Siller, M., Hernández-Castillo, F.D., Acosta-Zamarripa, A.M., Velásquez-Valle, R., González, E. y Sánchez-Yáñez, J.M. 2009. Microorganismos benéficos asociados a *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en guayabo (*Psidium guajava* L.) de Calvillo, Aguascalientes, México. Revista Mexicana de Fitopatología 27:106-112.

**Resumen.** Se identificó a *Meloidogyne incognita* como la especie del nematodo agallador que parasita al cultivo del guayabo, en la región de Calvillo (Aguascalientes, México). También se aisló hongos y bacterias benéficos asociados a suelo y raíces colectadas en las localidades de Cerro Blanco, Mesa Grande, La Labor y Malpaso. Veinte muestras distintas de *Meloidogyne* sp., fueron identificadas tomando en cuenta las características de patrones perineales de las hembras adultas así como por la observación de la región anterior de los machos. La especie *Meloidogyne incognita* fue identificada en todas las muestras. Los microorganismos benéficos aislados y asociados a la rizósfera del guayabo con uso potencial en control biológico, pertenecen a las especies de *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* y *Paecilomyces farinosus*. Además los nematodos edáficos *Rhabditis* y *Mononchus* fueron identificados en las muestras.

Palabras clave adicionales: *Bacillus* spp., *Paecilomyces* sp.

**Abstract.** The root-knot nematode species *Meloidogyne incognita* was identified as the one species that parasites guava orchards in the Calvillo region (Aguascalientes, Mexico). Beneficent fungi and bacteria were isolated as well, associated to soil and roots collected from the Cerro Blanco, Mesa Grande, La Labor and Malpaso locations. Twenty different *Meloidogyne* sp., samples were identified taking adult female perinea pattern characteristics into account, as well as the male anterior region observation. The *Meloidogyne incognita* species was identified in all the samples. The isolated beneficent microorganisms and associated to guava rhizosphere with a potential use in biological control, belong to the *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* and *Paecilomyces farinosus* species. Furthermore, the *Rhabditis* and *Mononchus* soil nematodes were identified in the samples.

Additional keywords: *Bacillus* spp., *Paecilomyces* sp.

#### INTRODUCTION

The guava (*Psidium guajava* L.) orchards in Mexico occupies an approximately 22,489 ha surface, distributed in 22 states. The main guava producer regions in Mexico are located in Aguascalientes, Michoacán and Zacatecas. This fruit

## INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo del guayabo (*Psidium guajava* L.) ocupa una superficie aproximada de 22,489 ha, distribuidas en 22 estados. Las principales regiones productoras de guayaba del país se localizan en Aguascalientes, Michoacán y Zacatecas. En el Municipio de Calvillo, Aguascalientes, este frutal ocupa 6,643 ha que representan el 30% de la superficie plantada a nivel nacional, con un rendimiento promedio de 16 ton/ha (González, 2000; SIAP, 2008). En Aguascalientes se producen 98 mil toneladas anuales de fruta y se dedican a este cultivo alrededor de 3 mil productores que generan 1.4 millones de jornales al año, sin considerar los empleos en la industria, transporte y comercialización de la fruta (González *et al.*, 2003). Los principales factores que limitan la productividad de las huertas de guayabo son de tipo agronómico: escasez y uso ineficiente del agua de riego, pobre fertilización, podas inadecuadas, presencia de plagas (picudo de la guayaba, *Conotrachelus* spp. Schönherr 1837; mosca de la fruta, *Anastrepha striata* Schiner, "temolillo", *Cyclocephala lunulata* Burmeister y la incidencia de enfermedades como clavo (*Pestalotia* sp. De Not); así como la presencia del nematodo agallador *Meloidogyne* spp., Göldi 1982, en el 90% de la superficie cultivada (Padilla *et al.*, 2000). Este problema constituye uno de los factores limitantes de este cultivo debido a las grandes pérdidas en la producción, que fluctúan entre el 48 y 57% (González *et al.*, 2003). Los primeros reportes sobre la presencia y daños del nematodo agallador de la región de Calvillo se realizaron a fines de la década de los 70's (Román, 1978; Ruiz, 1980; González y Rangel, 1985). Las especies del género *Meloidogyne* se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo (Sasser, 1995) siendo, *M. incognita* (Kofoid y White, 1919) Chitwood, 1949, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 y *M. hapla* Chitwood, 1949 las especies más comunes. Carrillo *et al.*, reportaron en 1990 para el Cañón de Juchipila, Zacatecas, la presencia de algunos géneros de nematodos fitoparásitos como *Helicotylenchus* Steiner, 1945, *Ditylenchus* Filipjev, 1936, *Aphelenchus* Bastian 1865, *Aphelenchoides* Fischer, 1894, *Criconemoides* Taylor, 1936, *Tylenchus* sp., Bastian, 1865 y *Dorylaimus* Dujardin, 1845, pero consideraron a *M. javanica* como el causante de los mayores daños en el cultivo del guayabo. Los síntomas aéreos (Fig. 1) se manifiestan por presencia de manchones en el campo con zonas de clorosis, aún con fertilización adecuada; otros síntomas son: marchites de las hojas; reducción del crecimiento y del rendimiento de la planta. Los síntomas en las raíces se manifiestan por la adhesión de partículas de suelo (Fig. 1) en los lugares donde se encuentra alojada la hembra adulta (Suárez *et al.*, 1995), necrosis externa e interna de las raíces, formación de agallas por multiplicación y aumento del tamaño de las células y proliferación del número de raíces por acumulación de sustancias de crecimiento (Avelar *et al.*, 2001, 2005). Se ha pretendido regular las poblaciones de nematodos mediante el empleo de hongos (Tribe, 1980; Román y Rodríguez, 1985, Culbreath *et al.*, 1986). Así, Freitas *et al.* (1995) aislaron 19 cepas de *Paecilomyces lilacinus* Saccardo 1886 y observaron que esos aislamientos

covers, in the municipality of Calvillo, Aguascalientes, a surface of 6,643 ha, representing 30% of the nationwide planted surface, with an average yield of 16 ton/ha (González, 2000; SIAP, 2008). Annually, 98 thousand tons of fruit are produced in Aguascalientes, having around 3 thousand producers dedicated to the cultivation of this particular fruit, generating 1.4 million wages a year, without taking into consideration the jobs derived from the industrialization, transportation and marketing of this fruit (González *et al.*, 2003). The main limiting factors of guava orchards productivity are agronomic: a shortage and inefficient use of irrigation waters, improper pruning, plagues presence (guava weevil, *Conotrachelus* spp. Schönherr 1837; fruit fly, *Anastrepha striata* Schiner, "temolillo", *Cyclocephala lunulata* Burmeister) and the incidence of diseases such as nail (*Pestalotia* sp. De Not), and the presence of the root-knot nematode species *Meloidogyne* spp., Göldi 1982 on 90% of the cultivated surface (Padilla *et al.*, 2000). This problem represents one of this cultivation limiting factors due to the large production profit loss, fluctuating from 47 to 57% (González *et al.*, 2003). The first reports on the Calvillo region root-knot presence and damage were performed in the late 70's (Román, 1978; Ruiz, 1980; González and Rangel, 1985). The *Meloidogyne* genus species are widely distributed around the world (Sasser, 1995), being *M. incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 and *M. hapla* Chitwood, 1949 the most common species. The presence of some genus of the phyto-parasite nematodes, such as the *Helicotylenchus* Steiner, 1945, *Ditylenchus* Filipjev, 1936, *Aphelenchus* Bastian 1865, *Aphelenchoides* Fischer, 1894, *Criconemoides* Taylor, 1936, *Tylenchus* sp., Bastian, 1865 and *Dorylaimus* Dujardin, 1845 were reported by Carrillo *et al.* 1990, but the *M. javanica* was considered by them as the major cause of damage on guava cultivation. The aerial symptoms (Fig. 1) become manifested by the presence of patches on the field with chlorosis areas, even with an adequate fertilization; some other symptoms are: Leave withering, a reduction of plant growth and yield. Symptoms on the roots become manifest by the adhesion of soil particles (Fig. 1) in the places where the adult female is lodged (Suárez *et al.*, 1995), external and internal root necrosis, gut formation by multiplying and cell size increase, as well as root proliferation by growth substance accumulation (Avelar *et al.*, 2001, 2005). The regulation of nematode populations has been intended throughout the use of fungi (Tribe, 1980; Román and Rodríguez, 1985, Culbreath *et al.*, 1986). Thus, 19 *Paecilomyces lilacinus* Saccardo 1886 strains were isolated by Freitas *et al.* (1995), observing that such isolations reduced the amount of knots produced by *Meloidogyne* spp. in tomato crops. Zavaleta and Van Gundy (1985) revealed evidence by means of *in vitro* experiments that the activity of volatile substances produced by *Serratia marcescens* Bizio 1823, *B. subtilis* Ehrenberg (1835) Cohn 1872, *B. cereus* Frankland and Frankland 1887, *Micrococcus luteus* (Schroeter) Cohn 1872, *E. coli* (Magula) Castellani and Chalmers 1919, as well as other unidentified rizo-bacterium are involved in the inactivation and death of the juvenile *M. incognita* second stage. It was

redujeron el número de agallas producidas por *Meloidogyne* spp. en el cultivo de tomate. En experimentos *in vitro*, Zavaleta y Van Gundy (1985) mostraron evidencias de que las sustancias volátiles producidas por la actividad de *Serratia marcescens* Bizio 1823, *B. subtilis* Ehrenberg (1835) Cohn 1872, *B. cereus* Frankland y Frankland 1887, *Micrococcus luteus* (Schroeter) Cohn 1872, *E. coli* (Magula) Castellani y Chalmers 1919, y otras siete rizobacterias no identificadas estuvieron involucradas en la inactivación y muerte del segundo estadio juvenil de *M. incognita*. Los resultados experimentales indicaron que las bacterias fueron capaces de producir compuestos nematotoxicos volátiles, solamente cuando la fuente de nitrógeno en su medio de crecimiento fue de origen orgánico. Dada la importancia de los microorganismos asociados a la rizosfera del guayabo como fuente de metabolitos activos para el control de nematodos, este trabajo planteo como objetivos: identificar las especies de hongos y bacterias asociados a las agallas de la raíz del guayabo así como las especies de *Meloidogyne* sp., presentes en la localidad de Calvillo, Aguascalientes, México.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

**Colecta de muestras.** La investigación se realizó en los ciclos 1999 y 2000 en las localidades de Cerro Blanco, Mesa Grande, La Labor y Malpaso, del Municipio de Calvillo, Aguascalientes, México, ubicado entre los paralelos 21° 43' y 00" y 22° 77' 00" de latitud norte y entre 102° 33' 00" y 102° 52' 00" de longitud oeste del meridiano de Greenwich, y a una altitud de 1680 msnm. En cada localidad se seleccionó una huerta que presentaba árboles de guayabo con síntomas aéreos ocasionados por nematodos para realizar el muestreo, seleccionando 20 árboles al azar con diferente grado de daño. De cada árbol, a una distancia de 1 m del tallo y con orientación norte, se obtuvo una submuestra de 2 kg de suelo y 200 g de raíz a una profundidad de 0-30 cm; las 20 submuestras de suelo y raíz se mezclaron, obteniendo una muestra compuesta/huerta que constó de 10 kg de suelo y 1 kg de raíz, las cuales se colocaron en bolsas de polietileno para trasladarse a los laboratorios de Fitopatología y Nematología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

**Identificación de hembras y machos de *Meloidogyne*.** De cada muestra de suelo se extrajo los nematodos en forma independiente, por medio de la técnica del Embudo de Baermann reportada por Thorne (1961). Para cada muestra se colocaron cinco embudos con 100 g de suelo por huerta; después de 48 h se obtuvieron los nematodos y se realizaron montajes, los cuales se identificaron de acuerdo al esquema de clasificación taxonómica propuesto por Thorne (1961), Jepson (1983) y Luc *et al.* (1988). Para confirmar la especie, de cada muestra de raíz se seleccionaron al azar veinte hembras de las cuales se obtuvo el patrón perineal, siguiendo la técnica de Taylor y Sasser (1978). Los cortes perineales se montaron en una gota de glicerina o lactofenol sellada con esmalte para uñas, se tomaron fotografías de los modelos perineales y se compararon con los presentados por Eisenback *et al.*, 1983 y Harman y Sasser, 1985. La obtención

*incognita* second stage. It was indicated by the experimental results that the bacterium were able to produce volatile nematotoxic compounds only when the nitrogen source in its growth environment came from an organic origin. The present study is aimed to identify fungi and bacterium species associated to guava root knots and to the *Meloidogyne* sp., species in the Calvillo, Aguascalientes, Mexico, due to the importance of microorganisms associated to guava rhizosphere as a source of active metabolites for nematode control.

#### MATERIALS AND METHODS

**Sample collection.** The study hereby was performed during the 1999 and 2000 cycles in Cerro Blanco, Mesa Grande, La Labor and Malpaso, from the Municipality of Calvillo, Aguascalientes, México, located in the 21° 43' and 00" and 22° 77' 00" parallels north latitude and in the 102° 33' 00" and 102° 52' 00" west longitude from the Greenwich meridian, at a 1680 msnm altitude. An orchard from each locality was selected presenting guava trees with aerial symptoms caused by nematodes to perform the sampling, choosing 20 trees randomly with a different damage level. A subsample of 2 kg soil and 200 g root at a 0-30cm depth were obtained from each tree 1 meter away from the stem north oriented; the 20 soil and root subsamples were mixed, getting a compound sample/orchard conformed by 10 kg soil and 1 kg root, which were placed in polyethylene bags to be transported to the Phyto-pathology and Nematology laboratories of the Parasitological Department from the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, in Buena Vista, Saltillo, Coahuila.

***Meloidogyne* male and female identification.** Nematodes were taken independently from each soil sample through Baermann funnel technique reported by Thorne (1961). Five 100 g soil funnels per orchard were placed for each sample; nematodes were obtained after 48 h and assemblies were held, which were identified according to the taxonomic classification scheme proposed by Thorne (1961), Jepson (1983) and Luc *et al.* (1988). Twenty females were selected at random from each root sample aiming to perform a species confirmation, obtaining the perinea pattern from them by following the Taylor and Sasser technique (1978). Perinea lacerations were mounted in a glycerin drop or lacto phenol sealed with nail polish; pictures of the perinea models were taken and compared with what had been reported by Eisenback *et al.* (1983) and Harman and Sasser (1985). Soil nematodes were obtained by Baermann funnel technique from soil samples, which then had assemblies performed becoming eventually identified using the pictorial Mai and Lyon (1975) and Cid del Prado (1995) keys.

**Soil and *Meloidogyne* spp. female bacteria collection.** Ten grams of soil were placed in 90 mL bottles containing a saline solution at 0.85-% and being shaken for 10 min afterwards. Serial dilutions were performed from this dilution, ranging from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-5</sup> in test tubes. Subsequently, the tubes were placed in a boiling water bath for 10 min at a 60°C temperature; 1.0 mL were taken from each tube and placed in a Petri plate with nutrient agar, having it dispersed with a glass rod; the plates were incubated at 28°C for 48 h, afterwards.

Eisenback *et al.*, 1983 y Harman y Sasser, 1985. La obtención de los nematodos edáficos se hizo mediante la técnica del embudo de Baermann a partir de muestras de suelo. De las cuales posteriormente se realizaron montajes y finalmente se identificaron mediante las claves pictóricas de Mai y Lyon (1975) y Cid del Prado (1995).

**Obtención de bacterias del suelo y de hembras de *Meloidogyne* spp.** Diez gramos de suelo se colocaron dentro de frascos conteniendo 90 mL de solución salina al 0.85 % y se agitaron durante 10 min. De esta suspensión se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$  en tubos de ensaye; posteriormente, los tubos se colocaron en baño María durante 10 min a una temperatura de 60°C; de cada tubo se tomó 1.0 mL y se colocó en caja Petri con agar nutritivo, dispersándolo con una varilla de vidrio; enseguida las cajas se incubaron a 28°C durante 48 h. Pasado ese tiempo se seleccionaron y purificaron en el mismo medio de cultivo las colonias bacterianas que presentaron las características de forma y borde irregular, color blanco cremoso y seco, características del género *Bacillus*. De igual manera para el aislamiento de bacterias de hembras de *Meloidogyne* spp, se extrajeron directamente de agallas hembras que presentaron coloración amarilla a café obscura y se colocaron en placas del mismo

After that period, the bacterium colonies which presented the characteristics of irregular edge and shape, as well as a creamy and dry white color typical of the *Bacillus* genus, were selected and purified in the same medium. Likewise, female knots presenting a yellowish to a dark brownish color were extracted directly for *Meloidogyne* spp., female bacteria isolation and placed on plates from the same medium (nutrient agar) for incubation and purification. A selection of five soil isolates and five originated from females was performed. A gram staining test was performed on those isolates, flagella presence, spore shape and position, glucose oxidation and fermentation, growth at 50°C, growth at 7% NaCl, acid and gas production, growth at pH 5.7, citrate utilization, starch hydrolysis and acetoin production for its identification (Gordon *et al.*, 1973; Schaad, 1980). The Biolog test system was used for *B. cereus* identification, sowing the bacterial colonies obtained in the middle of a BUG (Biological Universal Gram) to do so, added with maltose – Sodium thioglycollate– and incubated for 24 h. This particular procedure was repeated for two days consecutively in order to finally prepare a bacterial suspension at 28% turbidity; 150 µL from the previous suspension were placed in each well from the GP2 micro plate, they were incubated at 35°C having a reading taken after 24 h. A pattern was conformed based on the results derived from the color tests, which is interpreted by a computer program that faces positive vs. negative results for species identification by similarity tests (Biolo, 1999).

**Fungi obtaining in *Meloidogyne* spp. female.** Sixty females apparently parasitized were extracted from the knots of the roots, the body surface was disinfected with a 0.2 Sodium hypochlorite solution for 3 min.; they were placed in cultivation plates with potato dextrose agar (PDA) and incubated at 24°C from three to seven day, looking forward to allow the growth of fungi colonies, which were subsequently purified in Petri plates with PDA. The pure strains were cultivated in duplicate by microscopic observation, as the stock strain was kept under refrigeration for its proper maintenance.

## RESULTS Y DISCUSSION

Female *Meloidogyne* spp were obtained from the four sampled orchards, out of the galls formed in the roots of the infected tree (Fig. 1A, B). The characteristics of the cephalic ringed region (two rings) and the front of the stylus in a “paddle” with blunt, rounded base nodes and the distance from the base of the nodules to the opening of the dorsal esophageal gland (DEGD) correspond to *M. incognita* (Fig. 1C). Moreover, the perineal pattern with high dorsal arch, formed by grooves that differed from smooth to undulating corresponds to this species (Fig. 1D). The occurrence of *M. incognita* is consistent with Mata and Rodriguez reports (1985), to enter a list of 22 nematode species that parasite guava in Hawaii, having *M. incognita* inside of them and being one of the most important. A study performed by Kühn who found at least three *Meloidogyne* genus species parasitizing guava roots is reported by Cañizares (1968), which is a data similar to Avelar *et al.* 2001, who reported *M. incognita* (race 2), *M. javanica* and *M. arenaria* with 65, 31 and 4 % incidence. Concerning the

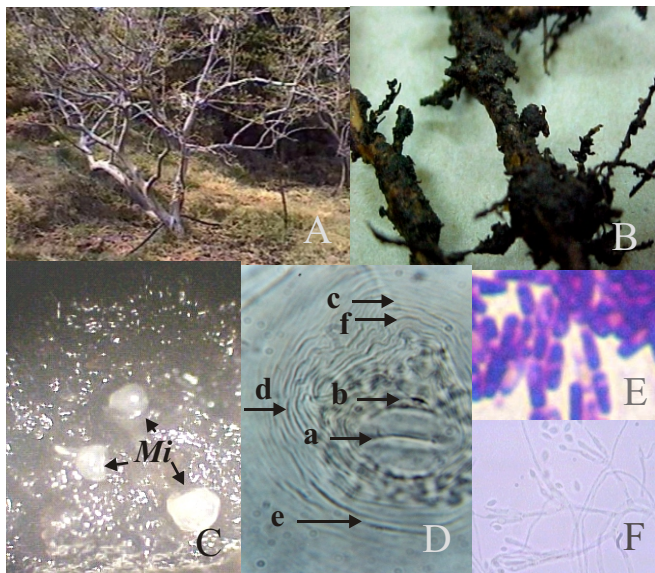


Fig. 1. Declinamiento del guayabo de la región de Calvillo, Aguascalientes, México. (A) Síntomas aéreos del guayabo causados por *Meloidogyne incognita* (Mi), (B) Raíz con agallas, (C) Corte longitudinal de una agalla mostrando las hembras del nematodo (Mi), (D) Corte perineal (a. Vulva, b. Poro anal, c. Arco dorsal, d., f. Líneas anales y e. Líneas vulvares). Microorganismos aislados y asociados a *M. incognita*, (E) *Bacillus cereus* y (F) *Paecilomyces farinosus*.

Fig. 1. Guava declining from the region of Calvillo, Aguascalientes, México. (A) Guava aerial symptoms caused by *Meloidogyne incognita* (Mi), (B) Root-knots, (C) Longitudinal gill section showing the nematode females (Mi), (D) Perineal cut (a. Vulva, b. Anal pore, c. Dorsal arch, d., f. Anal lines and e. Vulvar lines). Isolated microorganisms associated to *M. incognita*, (E) *Bacillus cereus* and (F) *Paecilomyces farinosus*.

medio de cultivo (agar nutritivo) para incubación y purificación. Fueron seleccionados cinco aislamientos provenientes de suelo y cinco originadas a partir de hembras. A dichos aislados se les realizó pruebas de tinción Gram, presencia de flagelos, forma y posición de espora, oxidación y fermentación de glucosa, crecimiento a 50°C, crecimiento en NaCl al 7%, producción de ácido y gas, crecimiento a pH 5.7, utilización de citrato, hidrólisis de almidón y producción de acetoina para su identificación (Gordon *et al.*, 1973; Schaad, 1980). Para identificar a *B. cereus* se utilizó el sistema de pruebas Biolog, para ello las colonias bacterianas obtenidas se sembraron en medio de Bug (Biological Universal Gram), adicionado con maltosa - tioglicolato de sodio y se incubaron 24 h. Este procedimiento se repitió dos días consecutivos para preparar finalmente una suspensión bacteriana a una turbidez del 28%. Se colocaron 150 µL de la suspensión anterior en cada pozo de la microplaca GP2, se incubaron a 35°C y se tomó la lectura después de 24 h. Con base en los resultados de coloración se conformó un patrón, el cual se interpreta a través de un programa computacional que confronta resultados positivos y negativos para identificación de las especies por similitud de pruebas (Biolog, 1999).

**Obtención de hongos en hembras de *Meloidogyne* spp.** De las agallas de las raíces se extrajeron 60 hembras aparentemente parasitadas, la superficie corporal de las cuales se desinfectó con una solución al 0.2% de hipoclorito de sodio durante 3 min. Se colocaron en placas de cultivo con papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a 24°C durante tres a siete días para permitir el crecimiento de colonias fungosas, las cuales se purificaron posteriormente en cajas de Petri con PDA. Las cepas puras se sembraron por duplicado para observación microscópica, mientras que la cepa madre se mantuvo en refrigeración para su mantenimiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las cuatro huertas muestreadas, se obtuvieron hembras de *Meloidogyne* spp. de las agallas formadas en las raíces de los árboles infectados (Fig. 1A,B). Las características de la región cefálica anillada (dos anillos) y la parte anterior del estilete en forma de "remo" con punta roma, nódulos basales redondeados y la distancia de la base de los nódulos a la abertura de la glándula esofágica dorsal (DGED) corta, corresponden a *M. incognita* (Fig. 1C). Además el patrón perineal con el arco dorsal alto, formado por estrias que variaron de lisas a onduladas que corresponden a la especie (Fig. 1D). La presencia de *M. incognita* coincide con los reportes de Mata y Rodríguez (1985), al consignar una relación de 22 especies de nematodos que parasitan al guayabo en Hawaii, dentro de ellos a *M. incognita* entre los más importantes. Cañizares (1968) reporta un trabajo realizado por Kühn, quien encontró cuando menos tres especies del género *Meloidogyne* parasitando las raíces de guayabo, datos similares a los de Avelar y colaboradores en 2001, quienes reportan a *M. incognita* (raza 2), *M. javanica* y *M. arenaria* con 65, 31 y 4 % de incidencia. En cuanto a los nematodos que se presentaron en las cuatro huertas en donde se llevaron a cabo los muestreos, se identificaron a los géneros *Rhabditis* sp. (Dujardín 1845, ) nematodo saprofito (Cepeda, 1996), así como *Mononchus* sp. (Bastian 1865,) depredador. La

nematodes presence in the four orchards where the samplings were performed, the genus identified were *Rhabditis* sp. (Dujardín, 1845) saprophytic nematode (Cepeda, 1996), as well as *Mononchus* sp. (Bastian 1865,) predator. The presence of *Rhabditis* spp. and *Mononchus* sp., has not been previously reported in guava cultivation in Aguascalientes.

**Bacteria isolation and characterization.** Beginning from the soil suspension and the female *Meloidogyne* spp., 18 bacterial colonies were recovered in nutrient agar, presenting a creamy white color, an irregular colonial growth, a convex surface and an abundant development. Ten bacterial colonies were positive to Gram Stain, revealed flagella occurrence and central or sub-terminal spore (Fig. 1), which corroborated that these colonies belong to the *Bacillus* sp. Genus (Schaad, 1980). The biochemical tests cited on Table I located the bacteria as *B. megaterium*, De Bary (1884) and *B. subtilis*, while *B. cereus* corresponded to the isolations from female *M. incognita* (Table 1); a bacteria previously reported by Zavaleta and Van Gundy (1985) with activity for *M. incognita* control. The bacteria growth properties and the properties reported by Schaad (1980) are shown in the comparative Table 1, confirming species similarity, thus. The growth test at 50°C was negative in the three species, as the NaCl at 7% was positive for the three bacteria. A positive reaction was shown by the three bacteria in the production of gas and glucose acid oxidation-fermentation. A positive reaction was shown by the three *Bacillus* species colonies in the acetoin test and the pH in the middle became reduced to less than six. A positive reaction was shown by the *B. cereus* and *B. subtilis* colonies in the acetoin test, while in the *B. megaterium* came out negative. A positive reaction was indicated by the three *Bacillus* species in the starch hydrolysis test. The reported bacteria discovery is important because these *B. subtilis* and *B. cereus* species are the same that Zavaleta and Van Gundy (1985), reported as associated in the inactivation and death of the *M. incognita* juvenile second stage. However, the three species have not yet been reported to be associated with *M. incognita* the way it was revealed in the study hereby, since both the cultivation and these nematode females became isolated. Also, a fungal colony was isolated from *Meloidogyne* females. The fungi, identified as *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) A. H. S. Br and G. Sm 1957, presented a white yellowish color of moderate growth; erect conidiophores with horizontal hyphae with phialides. The conidiophores and ramifications were divergent (Fig. 1F), conidia (fialospores) in dry basipetal chains, unicellular, from ovoid to fusiform, hyaline similar to those taxonomically described by Demach (1980). *P. farinosus* has not yet been reported as a female *Meloidogyne incognita* or nematode parasite; although, it has been reported as an insect parasite (Demach, 1980), while the only gut *Meloidogyne* spp., pathogen reported is *P. lilacinus* (Thom) Samson 1974 (Culbreath, 1986). It is concluded that the root-knot nematode species found parasitizing the guava cultivation in the four locations included in the study hereby (Cerro Blanco, Mesa Grande, La Labor and Malpaso) was *Meloidogyne incognita*. Other nematode genus that were found in the soil of *Meloidogyne incognita* parasitized guava trees were:

Cuadro 1. Características morfológicas y bioquímicas de las cepas bacterianas obtenidas de suelo y hembras de *Meloidogyne incognita* del cultivo del guayabo en Calvillo, Aguascalientes, México.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of bacterial strains obtained from soil and *Meloidogyne incognita* females from the guava cultivation of Calvillo, Aguascalientes, México.

| Prueba de Referencia          | Cepas aisladas |             |               | Cepas de referencia* |             |               |
|-------------------------------|----------------|-------------|---------------|----------------------|-------------|---------------|
|                               | B. cereus      | B. subtilis | B. megaterium | B. cereus            | B. subtilis | B. megaterium |
| Gram                          | +              | +           | +             | +                    | +           | +             |
| Flagelos                      | +              | +           | +             | +                    | +           | +             |
| Espora Oval                   | +              | +           | +             | +                    | +           | +             |
| Espora central                | +              | +           | +             | +                    | +           | +             |
| Oxidación                     | +              | +           | +             | +                    | +           | +             |
| Fermentación                  | +              | -           | -             | +                    | -           | -             |
| Crecimiento 50°C              | -              | -           | -             | V                    | -           | V             |
| Crecimiento NaCl 7%           | +              | +           | +             | +                    | +           | +             |
| Pdn de Acido y gas de glucosa | -              | -           | -             | -                    | -           | -             |
| Crecimiento PH 5.7            | +              | +           | +             | +                    | +           | +             |
| Utilización de Citrato        | +              | +           | +             | +                    | +           | +             |
| Hidrólisis de Almidón         | +              | +           | +             | +                    | +           | +             |
| Acetona                       | +              | +           | -             | +                    | +           | -             |

(+) Prueba positiva, (-) Prueba Negativa, (V) Prueba en reacción variable  
 Datos referenciales tomados de Schaad, 1980.

Reportada anteriormente en el cultivo del guayabo en Aguascalientes.

**Aislamiento y caracterización de bacterias.** A partir de la suspensión del suelo y de las hembras de *Meloidogyne* sp. se lograron recuperar en agar nutritivo 18 colonias bacterianas, las que presentaron color blanco cremoso, crecimiento de colonial de forma irregular, superficie convexa y desarrollo abundante. Diez colonias bacterianas fueron positivas a la tinción de Gram, mostraron presencia de flagelos y espora central o subterminal (Fig. 1), lo cual corroboró que dichas colonias pertenecen al género *Bacillus* sp. (Schaad, 1980). Las pruebas bioquímicas citadas en la tabla 1 ubicaron a las bacterias como *B. megaterium*, De Bary (1884) y *B. subtilis*, mientras que *B. cereus* correspondió a los aislamientos a partir de hembras de *M. incognita* (Cuadro 1); bacteria ya reportada por Zavaleta y Van Gundy (1985) con actividad para el control de *M. incognita*. En el cuadro comparativo 1, se muestra las propiedades de crecimiento de estas bacterias y las reportadas por Schaad (1980) confirmando con ello la similitud de la especie. La prueba de crecimiento a 50°C fue negativa en las tres especies, mientras que en NaCl al 7% fue positivo para las tres bacterias. En la producción de gas y ácido de glucosa oxidación-fermentación las tres bacterias presentaron reacción positiva. En la prueba de acetoina, las tres colonias de la especie de *Bacillus* mostraron una reacción positiva y el pH del medio se redujo a menos de seis. En la prueba de acetoina, las colonias de *B. cereus* y *B. subtilis* mostraron una reacción positiva, en tanto que en *B. megaterium* fue negativa. En la prueba de hidrólisis de

*Rhabditis* Dujardin 1845 and *Mononchus* Cobb, 1928. The *B. subtilis* and *B. megaterium* bacteria species were found associated to the guava cultivation soil, while *B. cereus* was frequently found associated to soil and *M. incognita* females, as well as the *Paecilomyces farinosus* fungi.

**Agradecimientos.** A Blanca Estela Mares Fermín y Cristina Sánchez Flores por su asistencia técnica en laboratorio.

#### LITERATURACITADA

- Avelar M., J.J., Sánchez G.P., Téliz O.D. y E. Zavaleta M. 2005. El declinamiento y su relación con el estado nutricional del guayabo (*Psidium guajava* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 23: 275-281.
- Avelar, M., J.J., Téliz O.D., y Zavaleta M.E. 2001. Patógenos asociados con el declinamiento del guayabo. Revista Mexicana de Fitopatología. 19: 223-229.
- Biolog Inc. 1999. Microlog TM System. Hayward, CA. 94545. USA.
- Cañizares, Z.J. 1968. La guayaba y otros frutos de Mirtáceas. Edición Revolucionaria. Instituto del Libro. La Habana, Cuba. 87p.
- Carrillo, R.J., Carrillo, F.C. y Domínguez, A.J.L. 1990. Nematodos asociados al cultivo de la guayaba *Psidium guajava* L. y control químico en el Cañón de Juchipila, Zacatecas, México. Revista Chapingo. 67 y 68: 94-97.
- Cepeda, S.M. 1996. Nematología Agrícola. Ed. Trillas, México, D.F. 135p.
- Cid del Prado, V.I. 1995. Claves de nematodos del orden Tylenchida Subórdenes Tylenchima y Aphelenchina. Colegio de Posgraduados. Programa de Fitopatología. Montecillos, Edo. de México. 67p.
- Culbreath, A.K., Rodríguez-Kabana, R. and Morgan Jones, G. 1986. Chitin and *Paecilomyces lilacinus* for control of *Meloidogyne arenaria*. Nematropica 16:153-166.
- Domsh, K.H. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London, New York. 600 p.
- Eisenback, J.D., Hirschmann, H., Sasser, J.N. and Triantaphyllou, A.C. 1983. Guía para la identificación de cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* especies), con una clave pictórica. (Traducción de Carlos Sosa-Moss). International *Meloidogyne* Project. Raleigh, North Carolina, USA. 40p.
- Freites, G., Feraz, S., and Muchosvej, J.J. 1995. Effectiveness of different Isolates of *Paecilomyces lilacinus* and an isolate of *Cylindrocarpon destructans* on the control of *Meloidogyne javanica*. Nematropica 25:109-114.
- Jepson, S.B. 1983. The use of second stage juvenile tails as an aid in the identification of *Meloidogyne* species. Nematologica 29:11-28.
- González, G.E. 2000. Tecnología para producir guayabo en Calvillo, Aguascalientes. Folleto para Productores No. 28. Campo Experimental de Pabellón. INIFAP. Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México. 13p.
- González, G.E. y Rangel, P. 1985. El guayabo rojo en la región Calvillo - Cañón del Juchipila. Informe anual Inv. SARH-INIA-CIANOC, CEDEC. 14p.

almidón, las tres especies de *Bacillus* indicaron una reacción positiva. El hallazgo de las bacterias reportadas es importante ya que estas especies *B. subtilis* y *B. cereus* son las mismas que Zavaleta y Van Gundy (1985), reportan como involucradas en la inactivación y muerte del segundo estadio juvenil de *M. incognita*. Sin embargo, no se ha reportado que las tres especies se encuentren asociadas *M. incognita*, tal y como se encontró en este estudio, pues se logró aislar tanto del cultivo como de hembras de este nematodo. También, se aisló una colonia fúngica a partir de hembras de *Meloidogyne*. El hongo, identificado como *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) A. H. S. Br and G. Sm 1957, presentó colonias de color blanco-amarillo de crecimiento moderado; conidióforos erectos con hifas horizontales con fialides. Los conidióforos y ramificaciones fueron divergentes (Fig. 1F), conidios (fialosporas) en cadenas basipétalas secas, unicelulares, de ovoides a fusiformes, hialinas semejantes a las descritas taxonómicamente por Demach (1980). *P. farinosus* no se ha reportado previamente como parásito de hembras de *Meloidogyne incognita* o de nematodos, aunque se reporta como parásito de insectos (Demach, 1980), mientras que el único patógeno de *Meloidogyne* spp., reportado es *P. lilacinus* (Thom) Samson 1974 (Culbreath, 1986). Se concluye que la especie del nematodo agallador que se encontró parasitando al cultivo del guayabo en las cuatro localidades incluidas en el estudio (Cerro Blanco, Mesa Grande, La Labor y Malpaso) fue *Meloidogyne incognita*. Otros géneros de nematodos que se encontraron en suelo de árboles de guayabo parasitados por *Meloidogyne* spp. fueron: *Rhabditis* Dujardin 1845 y *Mononchus* Cobb, 1928. Las especies de bacterias *B. subtilis* y *B. megaterum* se encontraron asociadas a suelo del cultivo del guayabo, mientras que *B. cereus* se encontró frecuentemente asociada a suelo y a hembras de *M. incognita*, así como también el hongo *Paecilomyces farinosus*.

González, G.E., Padilla R.S.J., Reyes M.L., Perales C.A.M. y F. Esquivel V. Principales plagas del Guayabo y su control en la región de Calvillo-Cañones. 2003. Memorias del Primer Simposium Internacional de la guayaba. Campo Experimental de Pabellón de Arteaga, Aguascalientes. INIFAP. 302p.

Gordon E.R, Haynes, W.C., and Pag, H.N. 1973. The genus *Bacillus*. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture. Washington, D.C., USA. 283p.

Hartman, K.M. and Sasser, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. pp. 69-77. In: K. R. C. Baker, C. Carter and J.N. Sasser (eds.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Volume II. Methodology. North Carolina State University Graphics. Raleigh, NC, USA. 223p.

Luc, M., Maggenti A.R. and R. Fortuner. 1988. A reappraisal of Tylenchina (Nemata). The Family Heteroderidae Filipjev and Schaurmans, Stekhoven, 1941. *Revue of Nematologic* 11:159-176.

Mai, N.F. and Lyon, H.H. 1975. Pictorial key to genera of plant – parasitic nematoda. 4th. Ed. Edit. Coinstock publishing associates a division of Cornell University Press. Ithaca y London. 220p.

Mata, B.I y Rodríguez, M.A. 1985. El guayabo, Aspectos de su cultivo y producción. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 160p.

Ruiz, O.J. 1980. Fitonematodos observados en el cultivo del guayabo y su control. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Ags. 30p.

Padilla, R.J.S., González, G.E., Esquivel, V.E. y Reyes, M.L. 2000. Manejo de problemas radicales del guayabo en Calvillo, Aguascalientes. Folleto Científico. No.7. Campo Experimental de Pabellón. INIFAP. Pabellón de Arteaga Aguascalientes, México. 19p.

Román, J. 1978. Fitonematología Tropical. Estación Experimental Agrícola. Río Piedras, Puerto Rico. 250p.

Román, J., and Rodríguez-Marcano, A. 1985. Effect of fungus *Paecilomyces lilacinus* on the larval population and root knot formation of *Meloidogyne incognita* in tomato. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. 69:159-67.

Sasser, J.N. 1995. Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology*. 9:26-29.

Schaad, N.W 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria American Phytopathological Society. St Paul, Minnessota, USA, 158p.

Servicios de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP - SAGARPA). 2008. Avances de siembra y cosecha. Resumen Nacional por producto de cultivos perennes riego+temporal. Octubre, 2008. [En línea]. [www.siap.sagarpa.gob.mx](http://www.siap.sagarpa.gob.mx)

Suárez, H.Z., Rosales, L., González, C., Rondón, A., Tellechea, V., Navas, R. y Solórzano, R. 1995. Asociación de hongos con el nematodo agallador del guayabo *Psidium guajava* L. VIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Resúmenes. *Revista Forestal Venezolana* 1:85.

Taylor, A.L. and Sasser, J.N. 1978. Biological identification and control of root knot nematodes (*Meloidogyne* species). North Carolina State University and U.S. Agency for International Development, Raleigh. North Carolina, USA. 111p.

Tribe, H.T. 1980. Prospects for the biological control of plant parasitic nematodes. *Parasitology* 81:619-639.

Thorne, G. 1961. Principles of Nematology. Mc Graw – Hill, U.S.A., New York. 553 p.

Zavaleta, M.E. and Van Gundy, S.D. 1985. Antagonist effect of bacteria on second stage larvae of *Meloidogyne incognita* in “in vitro” conditions. XXV Annual Meeting. American Phytopathological Society, Caribbean Division. Guanajuato, México. 198p.