



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRIA EN PROTECCIÓN VEGETAL

RELACIONES ENTRE *Jatropha curcas* L., *Orchesella bifasciata*
BOURLET Y HONGOS FITOPATÓGENOS

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

EDUARDO SANTIAGO ELENA

CHAPINGO, MEXICO, 20 DE JUNIO DE 2014



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



**RELACIONES ENTRE *Jatropha curcas* L., *Orchesella bifasciata* BOURLET Y HONGOS
FITOPATÓGENOS**

TESIS REALIZADA POR **EDUARDO SANTIAGO ELENA**, BAJO LA CODIRECCIÓN DEL
COMITÉ ASESOR INDICADO, APROBADA POR EL MISMO Y ACEPTADA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

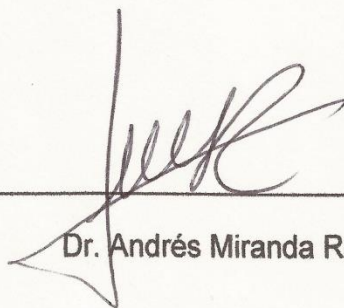
Jurado

Codirector



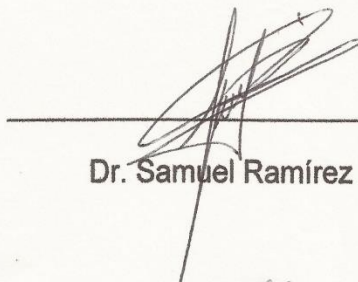
Dra. H. Gloria Calyecac Cortero

Codirector



Dr. Andrés Miranda Rangel

Asesor



Dr. Samuel Ramírez Alarcón

Asesor



M. C. Victoria Ayala Escobar



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA/
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Chapingo, México, Junio de 2014

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (**CONACyT**), por todo el apoyo brindado en el transcurso de la maestría, ya que sin la beca otorgada, no hubiera sido posible continuar con mis estudios de Postgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo (**UACH**) y al Departamento de Parasitología por haberme dado la oportunidad y así mismo brindarme todas las facilidades de formarme no solo en lo académico sino también en lo moral, y poder obtener el grado de Maestro en Ciencias.

A la **Dra. H. Gloria Calyecac Cortero**, quien me brindo su confianza, amistad así como su paciencia y guía no solo en el desarrollo de la tesis, ya que también ha sido un ejemplo de esfuerzo, dedicación y que constancia.

Al **Dr. Andrés Miranda Rangel**, por haberme dado su confianza, amistad y consejos para el desarrollo de esta investigación así como además de enseñarme el esfuerzo que se tiene que realizar para alcanzar un objetivo en la vida.

Al **Dr. Samuel Ramírez Alarcón**, por todo apoyo así sus valiosas contribuciones para el desarrollo y culminación de este trabajo de investigación.

A la **M. C. Victoria Ayala**, por la confianza y apoyo brindado, así como las aportaciones y consejos oportunos, durante la realización de este trabajo de investigación.

A los profesores de la Maestría en Protección vegetal y al Departamento de Parasitología Agrícola como de Preparatoria Agrícola por contribuir en mi formación académica y humana, y compartir sus conocimientos y experiencias profesionales de corazón muchas gracias.

DEDICATORIA

A **Dios** por darme la fuerza y estar conmigo en los momentos difíciles y permitirme lograr una meta más en mi vida; así como poner a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado durante toda mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorar cada día más

Al pueblo **mexicano** que con sus impuestos hace posible que exista una institución como la **Universidad Autónoma Chapingo**, que hace de aquellos que no tienen recursos y que tienen el deseo de superación profesionistas capaces de desarrollarse laboralmente y poner en alto el nombre de nuestra **Alma Mater**.

Al **Departamento de Parasitología Agrícola y a la Maestría en Protección Vegetal**, por darme la oportunidad de crecer en ella y brindarme los valores y conocimientos para poder ayudar al crecimiento de mi país.

A mis padres Amado y Silvia que son más que mis padres por haber creído en mí, y por haberme ayudado en esos momentos que más necesitaba.

A mis hermanas Guadalupe, Cristina y Maricela, por todo el apoyo y cariño que recibí y ser una parte muy importante de mi vida. A Erick, Jonathan y Mayte Dayana, por compartir momentos inolvidables.

A Julieta, por ser una gran inspiración en mi vida y por haber llegado en un momento especial y todo lo vivido contigo y por tus consejos.

A toda la 50ta generación de la Maestría en Protección Vegetal, por haber compartido demasiados momentos alegres así como ser parte de la formación en el Posgrado además de ser muy buenos amigos. A todas aquellas personas que de una u otra forma, fueron y son parte de mi vida, ya que sin ustedes no sería nada de lo que soy hoy. A todos mis amigos y compañeros, con los cuales vivimos demasiadas cosas en nuestra estancia.

DATOS BIOGRÁFICOS

Eduardo Santiago Elena, nació el 6 de noviembre de 1987 en el municipio de Xochitlán de Vicente Suarez, en el Estado de Puebla. Realizó sus estudios de Bachillerato de 2003 a 2006 en el Bachillerato Oficial General “Jorge Murad Macluf”, ubicada en el municipio de Xochitlán de Vicente Suarez, en el Estado de Puebla. Ingreso en el año 2006 a la Universidad Autónoma Chapingo y concluyó sus estudios como Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola en el año 2011. En el año 2012 ingreso al programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal en la misma Universidad donde concluyó sus estudios en el año 2013.

RELACIONES ENTRE *Jatropha curcas* L., *Orchesella bifasciata* BOURLET Y HONGOS FITOPATÓGENOS

THE RELATIONSHIP BETWEEN *Jatropha curcas* L., *Orchesella bifasciata* BOURLET AND PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Eduardo Santiago Elena¹ y H. Gloria Calyecac Cortero²

RESUMEN

Se realizaron colectas de colémbolos y hojas enfermas de *Jatropha curcas* L., en parcelas experimentales ubicadas en Xochitlán de Vicente Suarez, Puebla, de julio de 2012 a octubre de 2013. El objetivo fue determinar la relación entre *Orchesella bifasciata* (Bourlet) (Collembola: Entomobrydae), *J. curcas* y sus hongos fitopatógenos. La especie *O. bifasciata*, se determinó taxonómicamente y su identidad se corroboró mediante biología molecular. En las hojas se aislaron y determinaron taxonómicamente a los hongos *Chaetomium* sp., *Fusarium verticiloides*, *F. oxysporum*, *Helminthosporium* sp., *Alternaria alternata*, *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum gleosporioides* y *Phakopsora arthuriana*. Al observar el tracto digestivo de los colémbolos, las estructuras fúngicas presentes fueron de *Coniothyrium*, *Lasiodiplodia*, *Xilaraceo*, ascosporas de Ascomycetos. Del exoesqueleto se aislados a los hongos *Cladosporium* sp., *A. alternata*, *Penicillium* sp., *F. oxysporum*; y en el tracto digestivo a *Cladosporium*, *Penicillium*, *A. alternata*, *Cephalosporium* sp., *Leptosphaerulina* sp., *F. oxysporum*, *Trichoderma* sp. En un diseño completamente al azar en arreglo factorial se realizaron pruebas de preferencia alimenticia y el análisis de varianza de los datos mostró que *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Alternaria alternata*, fueron los hongos más atractivos para *O. bifasciata* ($p \leq 0.05$).

Palabras claves: *Jatropha curcas*, *Orchesella bifasciata*, hongos fitopatógenos, preferencia alimenticia.

ABSTRACT

Collembola and diseased leaves specimens of *Jatropha curcas* L. were collected in experimental plots in Xochitlán Vicente Suarez, Puebla, during the months of July 2012 to October 2013. The aim of this study was to determine the relationship between *Orchesella bifasciata* Bourlet, (Collembola: Entomobrydae) *J. curcas* and phytopathogenic fungi. The Collembola species was determined taxonomically and *Orchesella bifasciata* and identity using molecular biology. The leaves were isolated and fungi were taxonomically determined in which *Chaetomium* sp., *Fusarium verticiloides*, *F. oxysporum*, *Helminthosporium* sp., *Alternaria alternata*, *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum gleosporioides*, *Phakopsora arthuriana* was found. By observing the digestive tract of the Collembola, fungal structures were present including *Coniothyrium*, *Lasiodiplodia*, *Xilaraceo*, and ascospores of Ascomycetes. Isolated from the exoskeleton the following fungi were found; *Cladosporium* sp., *Alternaria alternata*, *Penicillium* sp., *F. oxysporum*; and in the digestive tract, *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria alternata*, *Cephalosporium* sp., *Leptosphaerulina* sp., *F. oxysporum*, and *Trichoderma* sp., were identified. A completely randomized design in a factorial arrangement of food preference tests were conducted and the analysis of variance of the data showed that *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., and *Alternaria alternata* were the most attractive to *Orchesella bifasciata* ($p \leq 0.05$).

Keywords: *Jatropha curcas*, *Orchesella bifasciata*, phytopathogenic fungi, food preference.

¹Tesista, Posgrado en Protección Agrícola Vegetal. Parasitología Agrícola. UACH.

²Director. Profesor-Investigador, Preparatoria Agrícola. UACH.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA	IV
DATOS BIOGRÁFICOS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VI
INDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE CUADROS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS PARTICULARES	4
HIPOTESIS.....	4
1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
1.1 Centro de Origen	5
1.2 Distribución.....	5
1.3 Clasificación taxonómica	7
1.4 Sinonimias	7
1.5 Nombres comunes.....	7
1.6 <i>Jatropha curcas</i> L. en el Estado de Puebla	8
1.7 Importancia y Usos de la Especie.....	8
1.8 Descripción Botánica.....	10
1.8.1 Morfología del Cultivo.....	10
1.8.2 Raíz	10
1.8.3 Tallo.....	10
1.8.4 Hojas	11
1.8.5 Flores	11
1.8.6 Fruto	12
1.8.7 Semilla.....	12
1.9 Problemas Fitosanitarios	12

1.10 Enfermedades Fungosas que Afectan a <i>Jatropha Curcas</i> L.	14
1.11 Importancia de los Microartropodos.....	16
1.12 Importancia de los Colémbolos	16
1.13 Depredadores y presas de Colémbolos.....	17
1.15 Colémbolos Fungívoros.....	18
1.16 Preferencias alimenticias de Colémbolos Fungívoros	19
1.17 Factores que influyen en la preferencia alimenticia.....	23
1.18 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en Colémbolos	25
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1 Localización del área de estudio	26
2.1.1 Zona de trabajo	26
2.1.2 Clima	26
2.1.3 Orografía	27
2.1.4 Hidrografía.....	27
2.1.5 Edafología	27
2.1.6 Vegetación	28
2.2 Fase de Campo	28
2.2.1 Manejo agronómico de las parcelas.....	30
2.2.2 Colecta de hexápodos (2012-2013)	30
2.2.3 Colecta de hojas de <i>J. curcas</i> con hongos fitopatógenos.....	36
2.3 Fase de Laboratorio.....	36
2.3.1 Determinación taxonómica y visualización del contenido intestinal...	37
2.3.2 Aclarado	37
2.3.3 Determinación Taxonómica.....	40
2.3.4 Determinación molecular (Secuencia).....	41
2.3.5 Determinación de las estructuras de los hongos (micelio, ascas, conidios) presentes en el tracto de digestivo de <i>O. bifasciata</i>	42
2.3.6 Purificación de hongos del tracto digestivo y exoesqueleto de <i>O. Bifasciata</i>	45
2.3.7 Determinación taxonómica de los hongos purificados del tracto digestivo y exoesqueleto de <i>O. bifasciata</i>	46

2.3.8 Preferencia alimenticia de <i>O. bifasciata</i> , sobre hongos fitopatógenos	50
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	53
6. CONCLUSIONES	88
6. LITERATURA CONSULTADA	89

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción del Agente causal, daño, y lugar de los principales problemas fitosanitarios reportados en <i>J. curcas</i> L.....	14
Cuadro 2. Características generales de los sitios de colecta en la Sierra Norte de Puebla, México	28
Cuadro 3. Fechas de colecta en la Sierra Norte de Puebla, México.....	31
Cuadro 4. Ubicación de las plantas de <i>J. curcas</i> en las plantaciones experimentales (Las ↑, representan las plantas muestreadas).....	32
Cuadro 5. Hongos aislados del follaje de <i>Jatropha curcas</i> L. del sitio A “Chicuasencuautla”	56
Cuadro 6. Hongos aislados del follaje de <i>Jatropha curcas</i> L. del sitio B “Sta. Lucia”	57
Cuadro 9. Total de aislamientos obtenidos del sitio A	69
Cuadro 10. Total de aislamientos obtenidos del sitio B	70
Cuadro 11. Total de aislamientos obtenidos del sitio A	74
Cuadro 12. Total de aislamientos obtenidos del sitio B	76
Cuadro 13. Resultados del análisis factorial de las pruebas de alimentación de <i>Orchesella bifasciata</i> en condiciones de laboratorio.....	82
Cuadro 14. Porcentaje de especímenes de <i>Orchesella bifasciata</i> que respondieron a la atracción de colonias de los hongos fitopatógenos y porcentaje de mortalidad de los colémbolos a diferentes tiempos de la realización de las pruebas desde la colecta de los colémbolos.	83
Cuadro 15. Porcentaje de especímenes de <i>Orchesella bifasciata</i> que se encontraron sobre las colonias y porcentaje de mortalidad en las pruebas con diferentes cepas de hongos fitopatógenos.	84
Cuadro 16. Porcentaje de especímenes de <i>Orchesella bifasciata</i> que se encontraron sobre las colonias de hongos fitopatógenos y porcentaje de mortalidad a diferentes tiempos.	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución y centros de origen del Género <i>Jatropha</i> (Fuente: Heller, 1996).	6
Figura 2. Ubicación política del municipio de Xochitlán de Vicente Suarez, Puebla.....	26
Figura 3. Parcela experimental de <i>Jatropha curcas</i> en Chicuasencuautla Sitio A, Xochitlán de Vicente Suarez, Puebla.....	29
Figura 4. Parcela experimental de <i>Jatropha curcas</i> en Santa Lucia Sitio B, Xochitlán de Vicente Suarez, Puebla.....	29
Figura 5. Colecta de hojas de <i>Jatropha curcas</i> L. con individuos de <i>Orchesella</i> <i>bifasciata</i>	33
Figura 6. Colecta y preservación de <i>Orchesella bifasciata</i>	34
Figura 7. <i>Orchesella bifasciata</i> en el envés de una hoja de <i>Jatropha curcas</i> L.	35
Figura 8. Ubicación de colémbolos en el envés de las hojas de <i>J. curcas</i> L. ...	35
Figura 9. Colecta de hojas con síntomas de hongos.	36
Figura 10. Inmovilizando a los colémbolos colectados mediante frio.....	37
Figura 11. (A) Colémbolos fijados en alcohol 70%, (B) en tratamiento de KOH 5% y (C) en medio de lactofenol.	38
Figura 12. Montaje de ejemplares de <i>Orchesella bifasciata</i> en liquido de Hoyer	39
Figura 13. Preparación semipermanente de un colémbolo.....	40
Figura 14. Determinación taxonómica de <i>Orchesella bifasciata</i>	41
Figura 15. Preparaciones semipermanentes de colémbolos, con el tracto digestivo lleno y esporas en el exoesqueleto.....	41
Figura 16. Ejemplar de <i>Orchesella bifasciata</i> en ayuno.....	42
Figura 17. Ejemplares de <i>Orchesella bifasciata</i> colocados en solución.....	43
Figura 18. Colémbolos tratados y realización de los bocados en las cajas Petri receptoras.....	44
Figura 19. Aislamiento de hongos del tracto digestivo.....	46
Figura 20. Conservación del material vegetativo con síntomas de hongos	47
Figura 21. Purificación de hongos fitopatógenos	49
Figura 22. Alimentación de los especímenes de <i>Orchesella bifasciata</i>	50
Figura 23. Vaciado de medio de cultivo PDA + ácido Láctico al 85% + estreptomicina.....	51
Figura 24. Preparación de medios receptores para las pruebas de preferencia.....	52
Figura 25. Transferencia del hongo a prueba a un medio de cultivo nuevo.....	52
Figura 26. Cajas Petri selladas con parafilm.....	53
Figura 27. Descripción de los colémbolos colectados en años 2012 y 2013. ...	54

Figura 28. Preparación semipermanente de <i>Orchesella bifasciata</i> en liquido de Hoyer	54
Figura 29. <i>Cladosporium</i> sp., (A) <i>Helminthosporium</i> sp., (B) <i>Penicillium</i> sp., (C) <i>Fusarium</i> sp., (D) y <i>Trichoderma</i> sp. (E)	57
Figura 30. <i>Fusarium oxysporum</i> cepa 1 (sitio A) <i>Fusarium oxysporum</i> cepa 2 (sitio B).....	58
Figura 31. <i>Phakopsora arthuriana</i> en <i>J .curcas</i>	59
Figura 32. Daño producido por <i>Colletotrichum gleosporioides</i> (Envés y haz)...	60
Figura 28. <i>Cladosporium</i> sp.	60
Figura 34. <i>Alternaria alternata</i>	61
Figura 35. Asociación del tracto digestivo de <i>Orchesella bifasciata</i> , con hongos fitopatógenos.	62
Figura 36. Cantidad de esporas determinadas en las preparaciones semipermantes en el sitio A	64
Figura 37. Cantidad de esporas determinadas en las preparaciones semipermantes en el sitio A	64
Figura 38. Total de aislamientos fúngicos del sitio A	66
Figura 39. <i>Cladosporium Jatropha</i>	67
Figura 40. Total de aislamientos fúngicos del sitio B	67
Figura 41. <i>Alternaria alternata</i> Figura 42. <i>Fusarium</i> sp. <i>Jatropha</i>	67
Figura 43. Total de aislamientos fúngicos del sitio A	69
Figura 44. Total de aislamientos fúngicos del sitio B	70
Figura 45. Total de aislamientos obtenidos del sito A.....	72
Figura 46. Total de aislamientos obtenidos del sito B.....	72
Figura 47. <i>Fusarium oxysporum</i>	73
Figura 48. <i>Cephallosporium</i>	76
Figura 49. <i>Leptosphaerullina (Pseudoplea)</i> (<i>Jatropha</i>)	77
Figura 50. <i>Fusarium oxysporum</i>	77
Figura 51. Micelio oscuro septado (<i>Jatropha</i>).....	77
Figura 52. <i>Trichoderma</i> (<i>Jatropha</i>)	77
Figura 53. Total de aislamientos obtenidos del sito A.....	78
Figura 54. Total de aislamientos obtenidos del sito B.....	78

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental es una de las causas del calentamiento global y por ende del cambio climático, las emisiones de CO₂, NO₄, CH₄ y otros gases han sido los responsables de este deterioro ambiental; así mismo la deforestación de nuestros bosques y selvas. Por otro lado, la disminución de nuestras reservas de petróleo pronosticadas para unos cuantos años, y el incremento del precio internacional del crudo, ha provocado un estado de alerta mundial, (Martínez, 2007), por lo tanto ha cobrado importancia la búsqueda y aprovechamiento de fuentes alternativas de combustibles. Las principales especies vegetales que proveen de biocarburantes son: caña de azúcar, sorgo, maíz, para etanol; soya, girasol y cacahuete, entre otros para biodiesel (Rodríguez *et al.*, 2012).

Durante varios años, el cultivo de *Jatropha curcas* L. ha sido considerado como una de los más prometedoras soluciones a los problemas generados por el cambio climático, la inseguridad energética y la pobreza rural en el desarrollo de los países (Achten *et al.*, 2008) además de ser una especie promisoría por su alta diversidad genética y capacidad de producción de aceite de excelente calidad como insumo para biodiesel.

J. curcas L., pertenece a la familia Euphorbiaceae, y actualmente es objeto de intensos estudios a nivel mundial, debido a su potencial como cultivo productor de semillas con alto contenido de aceite (Henning, 2004). Sirve como materia prima para la producción de aceite de calidad para usarse en la elaboración de turbosina y biodiesel. Las semillas de *Jatropha* proporcionan hasta 2,270 l ha⁻¹ de biodiesel, ostentando 51 cetanos (Gutiérrez *et al.*, 2010), es uno de los bioaceites más efectivos en el mundo.

Su uso es múltiple por su alta rusticidad y resistencia a la sequía; es un arbusto perenne utilizado en el sur de México como cerco vivo, funciona como un

importante proveedor de hojarasca al suelo siendo una fuente de materia orgánica; es altamente eficiente en la captura de carbono y retención de agua; posee ingredientes activos medicinales, microbicidas e insecticidas; algunas variedades mexicanas son comestibles y los subproductos de la industria del biodiesel generan glicerina y una pasta residual, ambos con uso potencial diversificado. El centro de origen del piñón es México y Centroamérica; Sin embargo, actualmente se encuentra en muchos países del trópico del mundo se utiliza también como tutores de otro cultivos y para el control de la erosión del suelo (Henning, 2004). En México, esta especie se distribuye mayormente en los estados de Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Martínez, 2006); sin embargo, las primeras investigaciones indican que la mayor riqueza genética se encuentra en los estados de Chiapas y Oaxaca.

Cuando se cultivan plantas de manera menos intensiva por lo general no sufren gravemente un ataque de plagas y patógenos (Agrios, 2005). Sin embargo en los últimos años el piñón mexicano se ha empezado a establecer en grandes extensiones en todo el mundo, de forma comercial, en un patrón de monocultivo intensivo, y las plantas tienden a presentar un alto riesgo de ser atacadas severamente por diferentes problemas fitosanitarios, sobre todo cuando no se realiza un manejo adecuado. Los problemas fitosanitarios se presentan en diversas partes de la planta y en las diferentes etapas fenológicas, siendo los más comunes: la pudrición de raíces, cuello y tallo, causados principalmente por hongos, en el follaje, frutos y flores también se presentan daños por plagas insectiles, que se alimentan de las estructuras de la planta, así como dispersan las esporas de hongos. La incidencia de problemas fitosanitarios afecta negativamente la productividad del cultivo, por lo que es indispensable conocerlos para poder tomar medidas de manejo y contrarrestar de manera oportuna las amenazas potenciales mediante un manejo integral en la que, entre otros elementos, se pueden utilizar agentes biorreguladores de plagas (Quiroga, 2010).

Uno de estos agentes podrían ser los colémbolos, que presentan un aparato bucal que los permite consumir las estructuras fúngicas (Wolter, 1963). Además de contener una gran cantidad de enzimas como amilasas, laminarinasas, xylanases, lichenases, celulasas, complejo de trehalosas para degradar los constituyentes de los hongos (Urbasek and Rusek, 1994). Estos organismos se desarrollan en diversos hábitats a diferentes altitudes y con diferentes temperaturas, así como en distintos tipos de suelos, tanto en épocas de alta humedad y semisecas por lo que su presencia puede ser un indicador de que existe más de una cadena trófica.

Por lo que para esta investigación se propuso como objetivo general determinar la preferencia alimenticia de *O. bifasciata* sobre hongos fitopatógenos de *J. curcas*, así como la relación que existe entre las enfermedades presentes en las parcelas, y la presencia de *O. bifasciata*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Demostrar la capacidad fungivora del colémbolo *O. bifasciata* Bourlet el cual realiza control de hongos fitopatógenos que afectan a *Jatropha curcas* L.
- Determinar a los hongos que sirven de alimento al colémbolo *O. bifasciata*
- Conocer si *O. bifasciata* es capaz de dispersar hongos llevando esporas viables en la cutícula y en el intestino.
- Evaluar el papel potencial de un *O. bifasciata* en la eficacia del biocontrol de hongos fitopatógenos (agentes fúngicos) y examinar las interacciones que pueden ocurrir en el proceso.

HIPOTESIS

- ✓ Debido a que los colémbolos son fungívoros, *O. bifasciata* consume algunos hongos fitopatógenos de *J. curcas* por lo tanto es un controlador de ellos.
- ✓ En el tracto digestivo y en la cutícula de *O. bifasciata* se encuentran estructuras de hongos fitopatógenos de *J. curcas*.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

El género *Jatropha* contiene aproximadamente 170 especies conocidas. Su nombre deriva del griego *Jatros* que significa doctor, y *trophe* que significa alimento, lo cual implica usos medicinales (Henning, 2007).

1.1 Centro de Origen

El cultivo de *Jatropha curcas* L. es de origen Mesoamericano (OCTAGON, S. A., 2006). Según Schmook *et al.* (1997) esta especie fue conocida y utilizada por los mayas. Wilbur (1954) menciona que sin duda era parte de la flora de México y probablemente en el norte de Centro América antes de la llegada de Cortés. Schmook *et al.* (1997) mencionan que, fue distribuida probablemente desde el Caribe por los navegantes portugueses a países de África; y también a países del sudeste de Asia, tales como Indonesia, Malasia y Filipinas. Según Heller (1996) especula que los portugueses fueron quienes difundieron la *Jatropha* por toda la zona tropical del viejo mundo, presumible durante el siglo XVIII.

1.2 Distribución

Jatropha curcas, es una especie con gran distribución en los trópicos, actualmente se distribuye desde México hasta Argentina, y en las Antillas. Presente en forma natural o cultivada en varias regiones de la cuenca amazónica, (Pérez, 2012) así como también ha sido introducida principalmente en África (Sánchez, 2008) y en países de Egipto como Etiopía, Ghana, India, Indonesia, Madagascar, Mali, Nepal etc., para ser cultivada con la finalidad de generar una fuente de energía alternativa a la de extracción de combustibles fósiles (OCTAGON, S. A., 2006).

Se le encuentra mayormente a bajas elevaciones, por debajo de los 1, 200 m.s.n.m., en áreas secas o húmedas, en planicies o colinas, con precipitaciones

de 300 a 1800 mm y temperaturas de 18 a 28°C, aunque se planta en sitios con temperaturas de hasta 34 °C (Pérez, 2012).

En la República Mexicana se encuentra distribuida en los estados de Chiapas, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Zacatecas y el estado de México (Sánchez, 2008). Sin embargo, las primeras investigaciones indican que la mayor riqueza genética se encuentra en los estados de Chiapas y Oaxaca (Martínez, 2006).

Las primeras siembras comerciales de piñón iniciaron en el año 2007 y se encuentran en los estados de Chiapas y Michoacán, estados que impulsan con, la participación social, privada y pública, programas de desarrollo para la producción de biocombustibles. (Zamarripa *et al.*, 2009).



Figura 1. Mapa de distribución y centros de origen del Género *Jatropha* (Fuente: Heller, 1996).

1.3 Clasificación taxonómica

Los últimos estudios, confirma que su centro de origen dada la diversidad genética existente, se encuentra en el sur de México y Centroamérica. (Zamarripa *et al.*, 2010, Henning, 2004)

-Clasificación botánica

Reino Plantae;

División: Magnoliophyta;

Clase: Magnoliopsida;

Orden: Malpighiales;

Familia: Euphorbiaceae;

Subfamilia: Crotonoideae;

Tribu: Jatrophaeae;

Género: *Jatropha*;

Especie: *J. curcas*. Linneo.

El género *Jatropha* contiene aproximadamente 170 especies conocidas. (Henning, 2007).

1.4 Sinonimias

Jatropha curcas presenta las siguientes sinonimias: *Castigliona lobata* Ruiz and Pav, *Curcas curcas* (L.) Britt, *Curcas adansoni* Endl. Ex Heynh, *Curcas indica* A. Rich, *Curcas purgans* Medic, *Jatropha edulis* Cerv, *Jatropha acerifolia* Salisb, *Jatropha yucatanensis*, *Ricinus americanus* Miller, *Ricinus jarak* Thunb (Bisse, 1988 y CAB International, 2012).

1.5 Nombres comunes

Jatropha curcas presenta una gran variedad de nombres comunes dependiendo del lugar donde esta especie se cultiva (Pérez, 2012).

En Cuba, *J. curcas* es conocida con el nombre común de piñón botija, piñón de cercas y piñón purgante (Bisse, 1988). En Perú se conoce como Piñol; en Costa

Rica y El Salvador como tempate; en España como coquillo; y en Honduras cotoncillo.

En México tiene varios nombres comunes en diversas lenguas indígenas: Ashcuahuitl en lengua náhuatl de Hidalgo, en náhuatl en Veracruz se escribe Ashté, Cak siil en lengua Huave de Oaxaca, Cuipi en Tzozil en Chiapas, Kxakalche en lengua maya en Yucatán, Que-ca en lengua Chontal en Oaxaca, Scu-luú lengua totonaca en Veracruz, Yaga-be-pale en zapoteco-Oaxaca y Xuta en el Totonacapan Poblano y Veracruzano (Lozoya, 2009).

1.6 *Jatropha curcas* L. en el Estado de Puebla

Se registran once especies de *Jatropha* en el estado de Puebla, que representan el 24% de la diversidad del género en México. Como una planta suculenta, la jatrofa es resistente a la sequía, y requiere entre 500 y 600 mm de lluvia. En tiempos de la sequía, la planta arroja la mayor parte de las hojas con el fin de reducir la pérdida de agua. La semilla y el rendimiento de aceite varían considerablemente según las condiciones de origen y de producción (clima, suelo, distancia entre plantas, el agua suministro, fertilizantes) (Münch y Kiefer, 1986).

1.7 Importancia y Usos de la Especie

El crecimiento en la demanda de biocombustibles obedece, principalmente, al mantenimiento de un estilo de vida consumista en los países desarrollados que, a su vez, impone pautas de comportamiento en las naciones emergentes. Se calcula que en el mundo existen poco más de cinco millones de hectáreas de *Jatropha curcas*; que para el 2015 alcanzarán trece millones de hectáreas (Ndong, 2009). La empresa líder en la producción de piñón en el mundo es la británica D1 Oils, que mantenía alrededor de 156 mil hectáreas en 2007 y planeaba duplicarlas en corto tiempo. Especialmente para el piñón se han

identificado alrededor de seis millones de hectáreas con alto y medio potencial productivo en México (Zamarripa y Díaz, 2008).

El interés por la especie *J. curcas*, conocida en México como “Piñón”, inició desde la primera mitad del siglo XIX, principalmente por las aplicaciones del aceite de sus semillas en la elaboración de detergentes y como combustible para lámparas (Heller, 1996). El contenido de aceite en la semilla varía de acuerdo al tipo de clima en que se desarrolle. En general, existen dos variantes de *J. curcas*, una tóxica, y otra no tóxica, o de muy baja toxicidad, proveniente de México (Martínez, 2007). En México, se encuentran materiales con bajo contenido de ésteres de forbol es decir no tóxicos, por lo que se pueden incluir en la alimentación humana, en los estados de Puebla y Veracruz, se preparan platillos regionales usando estas semillas (Martínez *et al.*, 2006). Otro uso, es la medicinal, ya que a la savia se le atribuyen propiedades curativas, (Bautista, 2007). El extracto obtenido a partir de sus hojas se usa como un nematocida contra *Meloidogyne incognita* (Kumar y Sharma, 2008; Sharma y Trivedi, 2002). El aceite de los frutos ha demostrado ser altamente tóxico para muchos microorganismos, insectos y animales, debido principalmente a su contenido en ésteres de forbol (Makkar *et al.*, 1997). Por lo tanto, se puede utilizar como un microbicida, fungicida, insecticida, molusquicida, piscicida y rodenticida (Adebawale y Adedire, 2006). Sin embargo, la principal ventaja económica de este aceite se mantiene en su uso como un biocombustible (Achten *et al.*, 2008).

Sin embargo, la especie aún se considera como no domesticada (Achten *et al.*, 2010), lo que implica que, las prácticas de reproducción, manejo y control de plagas, requieren desarrollarse. Ya que, aunque sus orígenes se ubican entre México y Centroamérica (Heller, 1996), existe poca información sobre los patógenos del suelo localmente importantes para la especie en el trópico mesoamericano.

1.8 Descripción Botánica

1.8.1 Morfología del Cultivo

Aspecto general: Es un arbusto grande, caducifolio (Héller, 1996), de crecimiento rápido, cuya altura normal es de dos a tres metros, pero puede alcanzar hasta ocho metros en condiciones especiales; El tronco presenta un fuste ramificado a poca altura (Alfonso, 2008), de 14-18 cm de diámetro, las plantas jóvenes tienen una corona delgada e irregular; corteza externa lisa escamosa y muy delgada, de color pardo claro, con pequeñas lenticelas; corteza interna lisa verrugosa de color verde oscuro; látex blanquecino con sabor amargo, olor a hierba fresca; ramas de 3–5 cm de diámetro, de color verde claro y grisáceo con cicatrices marcadas (Kobilke, 1989).

1.8.2 Raíz

Esta es variada debido a la forma de propagación de la especie, cuando es por semilla, sembrada directamente desarrolla un sistema normal, con cinco raíces, una central y cuatro periféricas (2 secundarias y 2 terciarias) (Alfonso, 2008). Cuando la planta se origina de semilleros dispuestos en bolsas o tubos de plásticos, las raíces no pueden crecer de forma normal, formando algunos nodos, las raíces laterales llegan a presentar escamas y el desarrollo de las raíces finas es muy poca, por ello las raíces no pueden explorar tan profundamente (Sharma y Serraf, 2007).

1.8.3 Tallo

El tallo es corto la planta demuestra crecimiento articulado (Kobilke, 1989), no hay uniformidad en el crecimiento de los tallos. El fuste está dividido desde la base, en ramas largas, con numerosas cicatrices producidas por la caída de las hojas en la estación seca (Alfonso, 2008).

1.8.4 Hojas

Las hojas son simples, alternas con peciolo de 5 a 35 cm de largo (OFI-CATIE, 2007), y anchura de 9 a 15 cm (Héller, 1996), pentalobuladas, delgadas, glabras, haz de color verde claro con nervios mediales y secundarios color amarillo y ligeramente unidos, el envés de color verde opaco con los nervios mediales y secundarios muy pronunciados, el margen entero, el ápice agudo, la base cordada, pubescente por el envés, nerviación palmitifida, con 5 nervios principales originados desde la base de la hoja (Miller *et al.*, 1962), las hojas son caducas (caducifolio) durante la época de verano (Alfonso, 2008).

1.8.5 Flores

La floración es monoica, presentándose los órganos masculino y femenino en la misma planta, (Alfonso, 2008). Las flores actinomorfas y dispuestas en racimos, 5 sépalos, de 5-7 mm de largo, corola de color amarillo verdoso campanulada, los pétalos de 0.5–1 cm de largo; 10 estambres unidos en la base con algunos abortivos, los filamentos delgados, las anteras ditécicas, con dehiscencia longitudinal, 5 nectarios presentes a un costado de la inserción de los estambres, ovario supero, trilocular con una placentación axilar, el estilo concrecente, el estigma dividido en seis partes (Heller, 1996).

En la inflorescencia, una flor femenina es rodeada normalmente por un grupo de flores masculinas. Las flores masculinas abren por un período de 8-10 días en la inflorescencia. Las flores femeninas abren solamente 2-4 días, las bisexuales abren pero raramente el ovario es funcional. Las flores masculinas poseen 10 estambres, los sépalos y los pétalos, en las flores femeninas se agrandan gradualmente después de la fertilización de los óvulos y protegen de las condiciones ambientales al embrión (Prakash *et al.*, 2007).

1.8.6 Fruto

El fruto es una drupa oval, de 4 a 5 cm de largo y 3 a 4 cm de ancho, en estado inmaduro presenta un color verde, y maduro se torna de un color amarillo de sabor amargo; contiene tres semillas de forma ovoide, de 20 a 24 mm de longitud y de 10-12 mm de ancho, tienen forma convexa en la parte dorsal y tectiforme en la ventral, presentando algunas líneas amarillentas, con una línea blanquecina apical, indicando la posición de la carúncula, el endospermo es grueso, el embrión está formado por cotiledones foliáceos, de 10-13 mm de longitud, de color blanco crema; las plántulas con cotiledones simples glabros y con la base redondeada, el margen entero; bordo liso (Miller *et al*,1962).

1.8.7 Semilla

Es relativamente grande, cuando está seca mide de 1.5 a 2.0cm de largo y 1.0 a 1.3 cm de diámetro; pesa entre 0.551 a 0.797g, puede tener, dependiendo de la variedad y de los tratamientos culturales, en proporción de 33.7 a 45% de cáscara y de 55 a 66% de almendra (Alfonso, 2008).

1.9 Problemas Fitosanitarios

Debido a que en diversas partes del mundo se han establecido desde plantaciones experimentales hasta comerciales de *J. curcas*, y debido a los diferentes sistemas de siembra pueden aumentar la importancia de algunas enfermedades tanto foliares como del suelo, es así que las plantas que se cultivan de una manera menos intensiva por lo general no sufren gravemente un ataque de plagas y patógenos. Sin embargo, cuando se cultivan intensamente en un patrón de monocultivo intensivo, las plantas tienden a presentar un alto riesgo de ser atacados severamente por diferentes problemas fitosanitarios, sobre todo cuando no se realiza un manejo integrado (Agrios, 2005). Muchas especies de hongos fitopatógenos pueden estar presentes simultáneamente en diversos suelos agrícolas, que son reservorios de propágulos fúngicos (esporas, esclerocios o micelio) y pueden vivir sobre las

plantas y sus residuos donde los hongos pueden llegar e invadir los tejidos del hospedante. Sin embargo las enfermedades que afectan a las plantas se pueden prevenir o reducir al mínimo, interfiriendo con sus procesos de infección. Son muchos los factores bióticos y abióticos que presentan los hongos patógenos al pasar de una fase saprofita a una fase parasitaria; estos factores y sus interacciones son muy complejos y no se conoce de forma exhaustiva. (Sabatini e Innocenti, 2000a).

1.10 Enfermedades Fungosas que Afectan a *Jatropha Curcas* L.

Cuadro 1. Descripción del Agente causal, daño, y lugar de los principales problemas fitosanitarios reportados en *J. curcas* L.

Agente causal	Daño	Reportado en:	Fuente
Patogenos			
<i>Phytophthora</i> spp.	Pudrición de raíz y tallo de plántulas	Australia	Heller, 1992
<i>Phytium</i> spp.	Pudrición de raíz y tallo de plántulas	Australia	Heller, 1992
<i>Fusarium moniliforme</i>	Pudrición de raíz y tallo de plántulas	Australia	Heller, 1992, CABI 2005.
<i>Helmintosporium tetrameta</i>	Manchas en hojas		Singh, 1983
<i>Cochliobolus spicifer</i>	Daño en hojas	Australia	CABI, 2005
<i>Pestalotiopsis paraguensis</i>	Manchas en hojas		Singh, 1983, Kar y Das, 1987
<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	Manchas en hojas		Singh, 1983
<i>Cercospora jatrophae-curcas</i>	Manchas en hojas		Heller, 2002, CABI, 2005
<i>Clitocybe tabescens</i>	Pudrición de raíz		Behl, 2009
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	Manchas en hojas		Behl, 2009
<i>Phakopsora jatrophiicola</i>	Roya en hojas		Behl, 2009
(<i>Capnodium</i> spp.)	Cubre el follaje evitando que realice fotosíntesis		Orihuela y Bocanegra, 2009
<i>Elsinoe brasilinesis</i>	Causa elongación en la planta		Behl, 2009
<i>Xhantomonas axonopodis</i> pv <i>malvacearum</i>	Se puede encontrar en toda la planta, manchas negras en hojas y frutos		CABI, 2005

Las enfermedades causadas por hongos han sido las más estudiadas hasta ahora. Éstos han sido detectados en todos los países en los que se cultiva *J. curcas* en forma extensiva. Lozano (2007) menciona un listado de patógenos que afectan a *J. curcas*, sin mencionar su distribución geográfica, incluyendo

Phytophthora spp. , *Pythium* spp. , y *Fusarium* spp. , *Helminthosporium tetramera*, *Pestalotiopsis paraguarensis* , *P. versicolor* , y *Cercospora* sp. En Indonesia estan reportados *Ralstonia solanacearum*, *Rhizoctonia bataticola*, *Phytophthora nicotianae* (República del Departamento de Agricultura de Indonesia, 2006), *Alternaria* sp. y *Cercospora* sp , *Fusarium* sp , *Botrytis* y *Xanthomonas campestris* (Prihandana y Hendroko 2006). En Guatemala, bajo condiciones de alta humedad (2000 mm anuales), se reporta a *Fusarium* spp. y *Erwinia* spp. como patógenos de elevada incidencia que atacan los tallos y hojas de la planta. (Biocombustibles de Guatemala, 2008). También se ha encontrado a *Phymatotrichum omnivorum* afectando siembras realizadas en suelos con poco drenaje (Félix, 2008).

Andrade y Gabriel, 2008 reportan varios patógenos que afecta a *J. curcas*, como la cenicilla (*Oidium hevea*), patógeno que se presenta en las hojas, causando defoliación y caída de frutos. Generalmente ocurre durante la estación seca. *Alternaria* (*Alternaria* spp.), que inicia como mancha foliar causando caída de hojas en forma prematura, empezando los daños por una mancha. En el caso de la roya (*Phakopsora jatrophiicola*), cuando se presenta, se establece directamente en las hojas, formando pústulas, lo que reduce la superficie fotosintética de la planta, en ataque mucho más fuertes provoca una defoliación completa de la planta. El ataque de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici*) se presenta en las hojas como manchas de 0.2 a 0.5 cm, y que pueden incrementarse hasta la muerte de la hoja completa. En los frutos también aparecen manchas características de color marrón

En Brasil se ha reportado la presencia de *Phakopsora jatrophiicola* (Arthur) Cummins, el causante de la roya, en el estado de Paraná (Gomes *et al*, 2009). Las inflorescencias de *J. curcas* son atacas en Brasil por el hongo *Amphobotrys ricini* lo que produce su caída (Lima, *et al* 2008). En la ciudad china de Beihai se reportó recientemente la presencia de gomosis en *Jatropha podagrica*. Esta enfermedad es causada por el hongo *Botryodiplodia theobromae* (Fu, 2011).

En el estado de Chiapas, México, el grupo del doctor Ricardo Quiroga ha determinado la presencia de 12 grupos de hongos fitopatógenos asociados a *Jatropha* spp. En las plantaciones de *J. curcas* de Yucatán se ha determinado recientemente la presencia de *Colletotrichum capsici* (Syd.) E. J. Butler & Bisby (Torres, 2011). Recientemente se ha aislado un actinomiceto, designado cepa KLBMP 1256T, de la superficie de los tallos de *J. curcas* en Sichuan, China (Xing, 2011).

1.11 Importancia de los Microartropodos

Los organismos edáficos son esenciales para la constitución de los suelos, estructura y el reciclado de la materia orgánica. Los colémbolos constituyen un grupo de invertebrados muy importante dentro del suelo debido al gran número de individuos, que pueden alcanzar hasta varios millones de ejemplares por metro cuadrado (Rusek, 1998). Mientras que los animales del suelo se consideran cada vez más generalistas y oportunistas en su comportamiento alimenticio.

1.12 Importancia de los Colémbolos

Algunos colémbolos que viven en el suelo pueden afectar el crecimiento de las plantas y el ciclo de los nutrientes, su función específica en las redes alimentarias en el suelo es poco entendida, los diversos estudios que se han realizado al suelo, sugiere que los colémbolos son principalmente de hábitos fungívoros, (Bardgett *et al.*, 1993; Hopkin, 1997; Rusek, 1998), es decir la dieta de los colémbolos que habitan en la hojarasca y el suelo consiste mayormente de esporas y micelios de hongos, levaduras, fragmentos de materia vegetal en descomposición y bacterias. Aquellas especies que acostumbran subir a la vegetación o que habitan permanentemente en esta ingieren con más frecuencia granos de polen y esporas de hongos (Christiansen, 1964). En donde se alimentan preferentemente de hongos saprofitos más que otros tipos de hongos. Aunque se pueden emplear diversas estrategias de alimentación,

especies edáficas se consideran principalmente fungívoros (Bardgett *et al.*, 1993; Hopkin, 1997; Rusek, 1998), y en gran medida depende mucho de esas fuentes de alimento. Por lo tanto, por medio de su actividad de alimentación influyen en el comportamiento de los hongos que viven en la mismas capas del suelo (Parkinson *et al.* 1979; Visser y Whittaker 1979; Newell 1984; Klironomos, *et al.*, 1992).

Es decir que el consumo sobre hongos saprofiticos, favorece la estimulación y crecimiento de los hongos micorrizicos (Lussenhop y Bassiri, 2005) así como una mejor disposición de N y P hacia las plantas a través de los desechos fecales (Gange, 2000). No está muy claro si los colémbolos prefieren a hongos micorrizicos o saprofitos, pero estudios en laboratorio demuestran que prefieren a los saprofitos (Jorgensen *et al.*, 2003; Klironomos y Kendrick, 1996). Sin embargo esta búsqueda de los colémbolos hacía los hongos, se ve limitada por las características estructurales del suelo, siendo una de estas los espacios porosos (Larsen *et al.*, 2004 ; Schrader y Lingnau , 1997), con lo que pueda dar más oportunidad a los saprofitos, que a los fitopatógenos.

1.13 Depredadores y presas de Colémbolos

Los colémbolos juegan un papel muy importante en el proceso de degradación de la materia orgánica y en la formación de la microestructura del suelo. Son hospedantes de muchos parásitos como protozoarios, nematodos, trematodos, y bacterias patógenas y así mismo son fuentes de alimento para muchos depredadores incluyendo a los escarabajos carábidos y otras larvas (Bauer, 1985), dípteros, hormigas (Holldobler and Wilson, 1990), ácaros (Karg, 1971), otros colémbolos (Cassagnau, 1972), ranas, reptiles y polluelos de faisán.

Ellos utilizan como fuente de alimento a protozoarios, nematodos, rotíferos, enquitreidos, bacterias, hongos, algas y plantas en descomposición, tejidos vivos de plantas y algunos hongos patógenos (Rusek, 1998). Son importantes diseminadores de los propágulos de la microbiota del suelo, especialmente en lugares de descomposición de la materia orgánica muerta.

1.15 Colémbolos Fungívoros

En la colembolofauna predominan las especies micofagas y muestran un alto grado de selectividad de alimentos fúngicos (Mills y Sinha, 1971; Lartey *et al.*, (1989). Algunos autores informan que los colémbolos al momento de consumir su alimento, pueden influir profundamente en la composición de la comunidad fungosa saprofítica del suelo, cambiando las relaciones de competencia. (Parkinson *et al.*, 1979; Newell, 1984; Klironomos *et al.*, 1992) A su vez, la calidad de los hongos utilizados como fuente de alimento pueden afectar las estrategias de vida de los colémbolos (Booth y Anderson 1979; Shaw 1988; Walsh y Bolger 1990; Chen *et al.*, 1995)

Poco se sabe sobre las interacciones entre los colémbolos y hongos parásitos. Se han encontrado que los propágulos de algunos hongos patógenos pueden ser aceptables para los colémbolos (Wiggins y Curl 1979; Curl *et al.*, 1988; Innocenti *et al.*, 1997), y en algunos casos se ha demostrado que los colémbolos puede causar cambios cuantitativos en las poblaciones de hongos de la rizosfera (Curl *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 1992; El Titi y Ulber 1991). Esto va a depender de la estratificación vertical de los colémbolos del suelo en correlación con la distribución del tamaño de los poros así como la humedad relativa y la disponibilidad de alimento (Rusek, 1998).

Los colémbolos son morfológicamente y ecológicamente diferentes en sus hábitos alimenticios. Ellos reconocen con las diferentes partes de su aparato bucal el alimento para digerir, como en el caso de la especie *Micranurida* que se alimentan principalmente de bacterias, levaduras y otros microorganismos de los fluidos de fermentación y las películas de agua que cubren las partículas sólidas del suelo. En el caso de *Pseudachorutes* spp; que presentan mandíbulas y maxilares modificados para detectar hongos, así como *Tetradontophora bielensis* que es depredador de nematodos, rotíferos, tardígrados, enchytridos e incluso otros colémbolos (*Friesea* spp., *Metisotoma grandiceps*) (Rusek, 1998). Los hábitos de alimentación se pueden reconocer

gracias a la morfología de las estructuras de su aparato bucal (Wolter, 1963) y el análisis del contenido intestinal (Rusek, 1985).

1.16 Preferencias alimenticias de Colémbolos Fungívoros

Los colémbolos han demostrado no presentar preferencias alimenticias no hay ninguna especie de hongo preferida en particular. Bardgett *et al.*, (1993) menciona que el consumo selectivo por parte de *Onychiurus latus* hacia el hongo *Marasmius androsaceus* en hojarasca de coníferas resultó en una reducción considerable de la actividad de este hongo, y un aumento en la abundancia del hongo *Mycena galopus* presente en la hojarasca, debido a un sabor desagradable para los colémbolos.

Este cambio en la estructura de las comunidades de hongos tuvo un efecto knock-on a escala de ecosistemas, reduce las tasas de descomposición de hojarasca de coníferas, ya que *M. galopus* descompone la hojarasca a un ritmo más lento que *M. androsaceus*. Este tipo de selección o presa puede basarse en muchos factores, pero es sobre todo en relación con el buen sabor de los hongos, la cual varía según la especie, la edad y estado fisiológico. Por ejemplo, se ha demostrado que el colémbolo *Folsomia candida* se alimenta de hifas metabólicamente activas en preferencia a hifas muertas o inactivas (Moore *et al.*, 1985) y también selecciona las regiones del talo de hongos con alto contenido de N (Leonard, 1984).

El consumo preferencial, es resultado de la evitación del consumo de toxinas producidas por algunas colonias de hongos (Parkinson *et al.*, 1979); Así mismo algunas especies de colémbolos localizan y seleccionan a los hongos, a partir de los compuestos volátiles que liberan, y que son agradables para los colémbolos (Bengtsson *et al.*, 1988).

El consumo preferencial hacia las estructuras fúngicas, tiene efectos directos, sobre la actividad y la abundancia de la presa, así como en alterar la estructura

de la comunidad fúngica. Es bien sabido, que un nivel intermedio de consumo de colémbolos en realidad aumenta la actividad y el crecimiento de los hongos seleccionados (Hanlon y Anderson, 1979;). Esta estimulación de proliferación de hongos, a menudo se ha referido como el crecimiento compensatorio, que se debe a un nuevo crecimiento de hongos después de haberse alimentado de hifas senescentes, y el nuevo crecimiento después del consumo, es crecimiento activo.

Por ejemplo, un estudio realizado por Hedlund *et al.*, (1991) demostraron que el consumo de *Onychirus armatus* sobre el hongo *Mortierella isabellina* inducen el cambio de hifas, es decir de un crecimiento adpreso a la esporulación de hifas, en sectores en forma de abanico, con crecimiento rápido y sin crecimiento micelial.

Estos autores también mostraron que las actividades de las enzimas amilasas, pueden actuar varias veces, en hongos con consumos continuos en aquellos hongos que no han sido probados. En contraste, si el consumo es muy pesado hacia las comunidades fúngicas, estas puede reducir su actividad, como lo muestran Warnock *et al.*, (1982) quienes descubrieron que una alimentación excesiva sobre los hongos micorrizicos, contrarrestan su relación mutualista con la planta huésped.

La ingestión y exposición de las estructuras fúngicas a los fluidos intestinales pueden influir en gran medida la actividad microbiana. Por ejemplo, las comunidades microbianas han demostrado ser más abundantes y activas, debido al paso por el intestino de los colémbolos (Brown, 1995), y las bacterias inactivas se pueden activar durante este viaje intestinal debido a la eliminación de las endosporas y a la germinación de esporas bacterianas (Fischer *et al.*, 1997). Sin embargo, los colémbolos también puede ser un medio hostil para las estructuras fúngicas, debido a lo que Moody *et al.*, (1996), mencionan que la germinación de esporas de hongos se pueden reducir considerablemente

después de la ingestión por los colémbolos, debido a la exposición a los fluidos intestinales.

Estudios sobre la preferencia alimenticia demuestran que inicialmente *Onychiurus vanderdrifti* prefiere a *Penicillium spinulosum*, pero más tarde la preferencia por este hongo disminuye, mientras que la preferencia por *P. janczewskii* (syn. *P. nigricans*) incrementa. En los cuatro y cinco días la preferencia a ambas especies de *Penicillium* es la misma, sin embargo luego se cambió a *P. janczewskii*, alcanzando los valores más altos de preferencia en el sexto y octavo día que posteriormente disminuye (Rusek, 1989).

Otras especies que se alimentan de hongos incluyen a *Tetradontophora bielensis*, que se alimenta de un amplio espectro de hongos durante el año de acuerdo a la disponibilidad de hongos del suelo (Matic y Koledin, 1985). Esto lo realizan debido a que ellos tienen sus propias enzimas (amilasas, laminarinasas, xylanases, lichenasas, celulasas, complejo de trehalasas), utilizan los diferentes constituyentes de la materia orgánica del suelo como alimento (Urbasek and Rusek, 1994).

Muchas especies atmobioticas son fitófagas y se alimentan de tejidos vegetales vivos (*Sminthurus viridis*, *Bourletiella* spp.), otras se alimenta de hifas y esporas de hongos y cambian sus requerimientos nutrimentales (polen, algas, tejidos de plantas) a través del año (Nadtochiy, 1987).

Curl (1979) encontró que una población mixta de especies de colémbolos, *Proisotoma minuta* Tullberg y *Onychiurus encarpatus* Denis, suprimió significativamente a *Rhizoctonia solani* Kuhn presente en plántulas de algodón en invernadero. Las interacciones entre la mesofauna micofaga y agentes de biocontrol de hongos en relación con patógenos y supresión de enfermedades se abordó por primera vez por Lartey *et al.* (1991), ellos mostraron que la combinación de *Laetisari arvalis* en un tratamiento de semillas con una población de colémbolos (*P. minuta*) resulto un control efectivo en contra de *R. solani* en algodón que con cualquier agente utilizado solo.

Los ensayos de alimentación de laboratorio han demostrado la selectividad alimenticia de *P. minuta* y *O. encarpatus* del patógeno en la presencia de *L. arvalis*, *T. harzianum*, y *G. virens* (Lartey et al., 1989).

Según Cook y Baker, (1983) los colémbolos se pueden considerar como uno de los factores que puedan afectar la competencia de enfermedades fúngicas en sustratos orgánicos. En estudios in vitro realizados por Sabatini e Innocenti (1995) demostraron que el colémbolo *Protaphorura armata* prefiere *Gaeumannomyces graminis* var. tritici y *Fusarium culmorum*, sin embargo cuando se hicieron crecer ambas colonias de los hongos en la misma placa de Petri en un medio agarizado, el colémbolo *Protaphorura armata* prefirió a *F. culmorum*, que a *G. graminis* var. Tritici. Eventualmente, *P. armata* disminuyó significativamente la gravedad de enfermedades causadas por estos hongos en las plántulas de trigo en ensayos realizados en microcosmos, donde los dos hongos se colocaron por separado (Sabatini e Innocenti, 2001).

Las hifas de *Bipolaris sorokiniana*, deben de ser evitadas, ya que producen un metabolito letal, pero para *Onychiurus pseudogranulosus* los conidios de *B. sorokiniana* son apetecibles (Sabatini e Innocenti, 1995). En pruebas de invernadero presento una supresión significativa de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (Lootsma y Scholte, 1997)

Shaw (1988), afirmó que hay factores químicos que pueden influir en la elección del alimento por parte de los colémbolos, como son la riqueza de nutrientes del micelio, la producción de hongos patógenos del suelo y los metabolitos secundarios tóxicos repulsivos.

Algunos estudios del microcosmos del suelo, sugieren que los colémbolos son principalmente de hábitos fungívoros en donde se alimentan preferentemente de hongos saprofitos más que otros tipos de hongos, siendo los hongos saprofitos el componente principal de las redes alimenticias del suelo, (Coleman et al , 1983; Rooney et al , 2006). También se ha demostrado que afectan al

nitrógeno (N) y fósforo (P) en el contenido de las plantas (Harris y Boerner , 1990) , así como las tasas del ciclo carbono (C) en el suelo (Johnson *et al.*, 2005).

Las hifas parecen ser favorecidas por la especie *Tomocerus flavecens*, ya que cuando se siembran, y se encuentran en condiciones de laboratorio son apetecibles para el colémbolo. (Knight y Angel, 1967) Sin embargo no todos los alimentos que son ingeridos por el colémbolo son degradados completamente ya que algunos componentes del bolo alimenticio pueden ser tóxicos (Kilbertus *et al.*, 1981). En el caso de *Tomocerus minor*, se realizaron tres aislamientos de hongos del tracto digestivo, de los cuales al alimentarse de estos hongos solo en una especie presentó un desarrollo normal de los individuos, mientras que en los otros dos eran perjudiciales para el crecimiento y fecundidad del colémbolo.

1.17 Factores que influyen en la preferencia alimenticia

Algunos factores que expliquen la preferencia alimenticia de colémbolos hacia los hongos, es todavía desconocida, aunque han surgido muchas sugerencias como:

1. Una pobre densidad de cuerpos miceliares, con lo cual permite a los individuos presentar más movimiento fácilmente. (Mills y Sinha, 1971)
2. La etapa de senescencia de las colonias fúngicas.(Moore *et al.*, 1987)
3. El valor nutricional de la cepa o más específicamente el contenido de nitrógeno.(Leonard, 1984)
4. Algo que se considera para los colémbolos que es muy útil en la selección de diversas especies de hongos es el olor que despiden. (Hedlund *et al.*, 1995).
5. Así como los metabolitos tóxicos que desprenden los hongos (Visser *et al.*, 1977)

La mayoría de los experimentos sobre preferencia alimenticia de colémbolos, se han logrado debido al uso de cepas puras de hongos desarrolladas en medio de cultivo. Sin embargo, se sabe que estas preferencias se ven afectadas por la naturaleza del medio de cultivo utilizado para el desarrollo del hongo (Leonard, 1984), tal vez se deba a cambios en el espectro de compuestos volátiles emitida por el hongo (Bengtsson, *et al.*, 1988).

En un examen microscópico se demuestra que cuando *Fusarium culmorum*, ingresa en el tracto digestivo de un colémbolo, la mayoría de conidios son dañados careciendo de contenido citoplasmático y, es así como los pellets fecales producidos por la alimentación de *F. culmorum* o *G. graminis* var. *Tritici*, mostraron que casi todos los conidios eran fragmentados. Por lo tanto los pellets no germinaban en medio de cultivo, a excepción de los de *Fusarium culmorum*. El tránsito a través del intestino dañaron los propágulos fúngicos debido a que los conidios e hifas carecían de contenido citoplasmático. Posiblemente se deba a la actividad de enzimas como las trehalasas, presentes en el intestino de *Protaphorura armata* (Urbasek y Rusek, 1994) y que probablemente explica la digestión del contenido celular de los hongos, que contiene principalmente trehalosa (Siepel, 1996). También se reduce la viabilidad de los inóculos y por lo tanto, la cantidad de propágulos viables transportados por colémbolos en su intestino o cutícula que probablemente es insuficiente para inducir o producir la enfermedad (Sabatini e Innocenti, 2001).

Sabatini e Innocenti (2001), encontraron resultados similares con diferentes especies de colémbolos y con otros hongos. Por lo tanto, los colémbolos podrían afectar la competencia entre los hongos patógenos hacia la planta.

1.18 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en Colémbolos

La PCR ha sido utilizado ampliamente y tiene el potencial de ser una herramienta molecular muy poderosa en taxonomía, especialmente para la identificación de especies muy pequeñas (Fрати, *et al* 1992). En el caso de los colémbolos para la identificación de especies individuales como por ejemplo en el caso de la especie *Isotoma viridis*, se presenta directamente la secuenciación del gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (CO II) basado en el método molecular del ADN (Rusek, 1998). La taxonomía basada en el DNA y estudios filogenéticos de colémbolos han ganado cada vez mayor importancia en los últimos años y podrían ser utilizados para resolver varias cuestiones (Fрати, *et al* 1992).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización del área de estudio

2.1.1 Zona de trabajo

El área de estudios se localiza, en la región II, Sierra Nororiental, el cual se encuentra situada geográficamente en la parte norte del estado de Puebla, entre los paralelos 19° 54' 00" y 20° 00' 42" de latitud norte y los meridianos 97° 36'18" y 97° 41'36" de longitud occidental a una altura que va de los 1000 a los 1200 msnm y colinda al norte con el municipio de Zoquiapan, Al este con Nauzontla, Al sur con Xochiapulco, Al oeste con Huitzilan y Zapotitlán de Méndez. (Figura 2).



Figura 2. Ubicación política del municipio de Xochitlán de Vicente Suarez, Puebla

2.1.2 Clima

Se identifican dos climas: clima templado húmedo con lluvias todo el año, se identifica en la porción meridional. Clima semicálido subhúmedo con lluvias todo el año se presenta en la porción central y septentrional (Anónimo, 1992).

2.1.3 Orografía

Rodeado por elevados cerros entre los que destacan por su altura el Elotépetl, el Mezcaltepetl, Oztolotepec y el Ixtaczayo, éste último es el de mayor altura del municipio, la parte central presenta una estrecha planicie intermontaña labrada por el río Zempoala y presenta la zona más baja del municipio. Por último, al sur se levanta una sierra irregular, destacando entre ella el cerro Catzunin que alcanza 1,200 metros sobre el nivel del mar la altura del municipio oscila entre 500 y 1,900 metros sobre el nivel del mar (Anónimo, 1992).

2.1.4 Hidrografía

Se ubica dentro de la cuenca del río Tecolutla de donde parte el río Zempoala, que nace en Chignahuapan y en el que desembocan los arroyos Apiapias, Questepolapan, Pecapan, Santa Elena y Ateno. El río Apulco es caudaloso y tiene un largo recorrido por la sierra norte antes de unirse al Tecolutla, recorre el suroeste del municipio en dirección suroeste a noreste y sirve como límite de los municipios de Xochiapulco y Zacapoaxtla a lo largo de más de cinco kilómetros. Y finalmente el río Zempoala que baña de oeste a este la porción central para unirse posteriormente al Tecolutla. También cuenta con arroyos intermitentes que se unen a los ríos ya mencionados (Anónimo, 1992).

2.1.5 Edafología

El territorio presenta tres grupos de suelos: Andosol: Ocupa extensas áreas del Suroeste y Centro-Este. Litosol: Se presentan en la ribera del Zempoala y del Apulco al Noreste. Luvisol: Se localizan en zonas dispersas del municipio. Los tipos de suelo en la zona son amarillo-rojizo, de la variedad Cambisol, cuya característica es la acumulación de arcilla y calcio susceptible a la erosión. La otra variedad presente, es un suelo joven, de color claro, denominado Regosol (Anónimo, 1992).

2.1.6 Vegetación

La vegetación que presenta es de bosque tropical subcaducifolio, acompañado de un bosque de pino-encino (*Pinus moctezumae*, *Pinus-strobus*). En épocas recientes y debido a la introducción de potreros y cafetales, en la zona media y baja de la Sierra, se observa la aparición de una vegetación secundaria con maleza. En algunas partes se puede encontrar además, cedro (*Cedrela mexicana*), olivo, (*Oleo europaeae*) y nogal (*Juglans regia*) (Anónimo, 1992).

2.2 Fase de Campo

El presente trabajo se realizó en el estado de Puebla. La zona de estudio “Chicuasencuautla” y “Santa Lucia, están situadas en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, dentro de la Sierra Norte de Puebla; (Cuadro 2.)

Cuadro 2. Características generales de los sitios de colecta en la Sierra Norte de Puebla, México

Muestra	Lugar	Ubicación geográfica	Altitud (m)	Cultivos
Sitio A	Chicuasencuautla Xochitlán de Vicente Suarez Puebla	19° 57' 60" N y 97° 38' 41.54" O	1024	<i>Jatropha curcas</i> , <i>Zea mays</i> y <i>Coffea</i> <i>arábiga</i>
Sitio B	Santa Lucia Xochitlán de Vicente Suarez Puebla	19° 58' 18" N y 97° 38' 01.61" O	942	<i>Jatropha curcas</i> y <i>Coffea arábica</i>



**Figura 3. Parcela experimental de *Jatropha curcas* en Chicuasencuautla
Sitio A, Xochitlán de Vicente Suarez, Puebla**



**Figura 4. Parcela experimental de *Jatropha curcas* en Santa Lucia Sitio B,
Xochitlán de Vicente Suarez, Puebla**

2.2.1 Manejo agronómico de las parcelas

En el sitio A, Chicuasencuautla, el manejo que se le dio a la parcela experimental de *Jatropha curcas* L. fue poco debido a que el cultivo requiere de mínimas labores culturales. Algunas de estas labores fueron la eliminación de malezas de forma manual o con la ayuda de un machete o un azadón, no se aplicó ningún tipo de fertilizantes en la parcela de estudio y la materia orgánica presente fue la que se acumuló de la caída de las hojas de los árboles adyacentes de las especies *Inga vera* y, *Coffea arabica*. La cosecha se realizó de forma manual.

En el sitio B, Santa Lucia, el manejo que se dio a la parcela fue variado. Una de las actividades realizadas fue el combate de malezas de forma mecánica mediante la ayuda de una desbrozadora así como el manejo químico de las mismas empleando un herbicida, el activo químico usado fue Glifosato. Otra actividad fue la poda de los arbustos de *Coffea arabica*, ésta se hizo de forma manual con tijeras para podar. Para la fertilización se aplicó urea al 46% y triple 17 en forma de granulado aplicado al suelo, también se usaron fertilizantes foliares como Bayfolan en solución de polvo humectable y se aplicaron fungicidas a base de cobre como el sulfato de cobre pentahidratado y clorotalonil.

2.2.2 Colecta de hexápodos (2012-2013)

Durante julio de 2012 y octubre de 2013, se llevaron a cabo observaciones y posteriormente se procedió a coleccionar hexápodos, y hojas de *J. curcas* L. Las plantas muestreadas fueron aquellas que presentaron los síntomas de albergar hongos que fueron principalmente las que mostraron lesiones angulares de color café oscuro a negro, este tipo de lesiones también se presentó en las nervaduras y fue más visible aún en el envés; la mayoría de las plantas de la muestra tuvo la presencia de colémbolos. Las plantaciones de *J. curcas* L., se encontraron intercaladas con cafeto (*Coffea arabica*) y maíz (*Zea mays*), ubicadas en los sitios A “Chicuasencuautla” y el sitio B “Santa Lucia”.

Cuadro 3. Fechas de colecta en la Sierra Norte de Puebla, México.

Sitios de muestreo y tipo de Colecta	Fecha de Colecta	T° Promedio	T° Alta	T° Baja	HR	Velocidad del viento (Km/h)
Sitio A y B Colémbolos en follaje y hojas con síntomas de hongos	21 de julio de 2012	21.6	21.6	20.2	88	0.0
Sitio A y B Colémbolos en follaje y hojas con síntomas de hongos	17 septiembre de 2012	21.9	21.9	21.2	94	0.0
Sitio A y B Colémbolos en follaje	22 noviembre de 2012	20.2	20.2	17.7	82	0.0
Sitio A y B Colémbolos en follaje	22 diciembre de 2012	24.6	24.6	22.8	64	1.6
Sitio A y B Colémbolos en follaje	25 de marzo de 2013	12.5	12.5	11.8	99	0.0
Sitio A y B Colémbolos en follaje	6 de mayo de 2013	13.4	13.7	13.4	99	0.0
Sitio A y B Colémbolos en follaje	21 junio de 2013	20.1	20.1	19.5	100	0.0
Sitio A y B Sitio A y B Colémbolos en follaje	30 de julio de 2013	25.3	26.7	25.3	76	0.0
Sitio A y B Colémbolos en follaje	1 de agosto de 2013	19.4	19.6	19.4	95	0.0
Sitio A y B Colémbolos en	1 de	25.1	25.9	25.1	81	1.6

follaje	septiembre					
Sitio A y B Colémbolos en follaje	8 de octubre de 2013	28.3	28.3	27.9	72	1.6

Cada parcela experimental de *J. curcas*, tuvo 7 surcos y 17 plantas, con un total de 119 plantas y un marco de plantación de 4x2 m. De cada sitio de muestreo se tomó el 20% del total de las plantas, la selección de plantas se realizó a través de números aleatorios proporcionados por el Programa SAS system V9. De cada planta se tomaron 3 hojas del segundo tercio de la planta, esto se realizó en los dos sitios de muestreo. Sólo se tomaron plantas con follaje de cada zona experimental, no se repitieron los mismos números y tampoco se muestreó dos o más veces la misma planta.

Cuadro 4. Ubicación de las plantas de *J. curcas* en las plantaciones experimentales (Las ↑, representan las plantas muestreadas)

Surcos\Hileras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	↑	X	X	↑	X	X	↑	X	↑	↑	X	X	↑	X	X
3	X	X	X	X	X	X	X	↑	X	↑	X	↑	X	↑	X	X	X
4	X	↑	X	↑	↑	X	X	X	X	↑	X	X	X	X	X	↑	X
5	X	X	X	X	X	↑	X	X	X	X	X	↑	↑	X	↑	X	X
6	X	↑	↑	X	X	X	↑	X	↑	X	↑	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Las colectas de hexápodos se realizó empleando la siguiente técnica:

Se colectó hojas de *J. curcas* con presencia de hongos y colémbolos las cuales se introdujeron en bolsas de plástico transparente de 2 kg de capacidad; de forma cuidadosa se introdujeron en la bolsa desde el ápice hasta el pedicelo tratando de no mover demasiado la hoja para evitar que saltaran los colémbolos, ya que al verse en un estado de peligro los colémbolos utilizan su furcula para saltar. En cada bolsa se colocaron alrededor de 10 a 15 hojas, para evitar que se perdiera humedad del medio se agregó de 3 a 5 mL de agua destilada estéril con la ayuda de un atomizador. Para permitir la aireación se

realizaron pequeñas perforaciones a cada bolsa con agujas de disección y de esta forma se mantuvo con vida a los hexápodos. Cada bolsa se selló con cinta y se etiquetó, por último todas las muestras se guardaron en una hielera con gel congelado para su posterior extracción, lo anterior se realizó para no alterar las condiciones de vida de los colémbolos y poder manipularlos posteriormente.



Figura 5. Colecta de hojas de *Jatropa curcas* L. con individuos de *Orchesella bifasciata*.

Técnica 2

Lo siguiente fue coleccionar los colémbolos de las dos zonas de estudio directamente de las hojas, únicamente se tomaron los organismos que se encontraban en el follaje de la *J. curca* L.

- a. Se verificó que las hojas del segundo tercio de la planta, ya que ahí fue donde se encontraba mayor cantidad de colémbolos, se colectó hoja por hoja.
- b. Las hojas fueron diseccionadas con la ayuda de un bisturí sobre una tabla, los pedacitos cortados fueron introducidos en frascos de plástico de 84 mm x 39 mm los cuales contenían una capa de hojarasca de 1 cm de grosor. Cada pedazo de hoja diseccionado se acomodó delicadamente en el frasco de tal modo que el colémbolo no fuera

dañado, esto se hizo hasta que el frasco llegó a tener $\frac{3}{4}$ de su capacidad.

- c. Después se agregó medio gramo de levadura de cerveza por frasco y se procedió a sellarlos con tela de organza ajustándola con una liga para permitir la aireación de los colémbolos.
- d. Posteriormente se roció agua destilada estéril en forma de microaspersión sobre la tela de organza, el agua se filtró y de esta forma se mantuvo la humedad en las cámaras.
- e. Se etiquetó todos los frascos con los siguientes datos: Sitio de muestreo, fecha de colecta, cultivo en el que se encontraron los especímenes, al final los frascos fueron colocados en una hielera para su transporte.



Figura 6. Colecta y preservación de *Orchesella bifasciata*.



Figura 7. *Orchesella bifasciata* en el envés de una hoja de *Jatropha curcas* L.

Se observó que el tracto digestivo, estaba completamente lleno de alimento.
(Se observaba una línea café que recorría longitudinalmente al hexápodo



Figura 8. Ubicación de colémbolos en el envés de las hojas de *J. curcas* L.

2.2.3 Colecta de hojas de *J. curcas* con hongos fitopatógenos

Las hojas seleccionadas en cada colecta fueron colocadas en bolsas de papel. En cada bolsa se colocaron alrededor de 8 a 10 hojas dependiendo del tamaño de cada una de ellas así se mantuvieron frescas las hojas. Cada bolsa se selló con cinta y se etiquetó, por último todas las muestras se guardaron en una hielera.



Figura 9. Colecta de hojas con síntomas de hongos.

2.3 Fase de Laboratorio

El material colectado fue llevado al laboratorio de Micro y Mesofauna, del Área de Biología, de la Universidad Autónoma Chapingo, (km 38.5 Carretera México- Texcoco, Chapingo, Estado de México) donde se colocaron las hojas con los hexápodos en un congelador a -20°C por 50 minutos para inmovilizar a los colémbolos.



Figura 10. Inmovilizando a los colémbolos colectados mediante frio

2.3.1 Determinación taxonómica y visualización del contenido intestinal

Se determinó taxonómicamente a los colémbolos y al mismo tiempo se visualizó el contenido intestinal de estos para lo cual se tuvo que seleccionar colémbolos de dos sitios de muestreo distintos. Los colémbolos seleccionados fueron aquellos que presentaron estructuras fúngicas en el tracto digestivo, para este propósito se utilizó un microscopio estereoscópico Carl Zeiss Discovery V8.

Preparación de las muestras

2.3.2 Aclarado

Para la preparación de las muestras se procedió a la fijación en alcohol al 70 % de la siguiente manera:

1. En un portaobjeto excavado se vertió 1 mL de hidróxido de potasio (KHO) al 5 % y se colocó 3 individuos, se dejaron por 60 segundos, con el fin de que se degradara la quitina del exoesqueleto, pero sin dañarlo y así poder tener una mejor visualización del tracto digestivo.

2. Después del procedimiento anterior se transfirieron a otro portaobjeto excavado en donde se agregó de 1 a 2 mL de lactofenol, después se calentó con un mechero de alcohol hasta que el lactofenol alcanzó la ebullición. El tiempo de exposición varió dependiendo del tamaño de los ejemplares ya que si se deja calentar demasiado se puede destruir a los hexápodos a observar para evitar eso se observó constantemente a los colémbolos con el microscopio estereoscópico, cuando era visible el tracto digestivo, se retiraban del calor.
3. El lactofenol se dejó en los portaobjetos excavados y los colémbolos fueron colocados dentro una caja de Petri bien cerrada, a temperatura ambiente por un lapso de 2 a 5 días.



Figura 11. (A) Colémbolos fijados en alcohol 70%, (B) en tratamiento de KOH 5% y (C) en medio de lactofenol.

Montaje

1. Antes de pasar los ejemplares al líquido de Hoyer, se les retiro el exceso de lactofenol para evitar que se formaran cristales en la preparación e impidieran la visualización de las estructuras del tracto digestivo. Cada colémbolo se tomó con el borde de una pequeña espátula y después fue colocado suavemente en papel para que por medio de la absorción fueran retirados los residuos de lactofenol.
2. Después se colocó en el centro de un portaobjetos, con la ayuda de una aguja de disección, una gota de líquido de Hoyer.
3. Se tomó cada colémbolo con la espátula y la aguja de disección para luego sumergirlos en el líquido de Hoyer. Con la ayuda de un

microscopio estereoscópico Carl Zeiss Discovery.V8 se pudo observar a los colémbolos en posición dorsal, ventral o lateral.



Figura 12. Montaje de ejemplares de *Orchesella bifasciata* en líquido de Hoyer

4. Se cortó un cubreobjetos de 22x22 mm en 9 partes, con la ayuda de un lápiz de diamante. Con una pinza del número 5 se tomó una fracción del cubreobjetos cortado y se colocó muy cerca de la gota del líquido de Hoyer, formando un ángulo de 45°, sin hacer presión se dejó deslizar suavemente, hasta que cubrió perfectamente a la gota.
5. En los casos que la gota con líquido de Hoyer no llenó totalmente el cubreobjetos se procedió a utilizar una cantidad mayor del mismo fluido para llenar los espacios vacíos.
6. Las preparaciones se etiquetaron con los siguientes datos: del lado izquierdo se colocó el nombre del sitio de muestreo; la localidad, fecha de la colecta, cultivo donde se encontró, altitud, número de muestra y la temperatura. Los datos para la determinación taxonómica, familia, género, especie, autor y año, de los colémbolos así como de los hongos del tracto digestivo se colocaron del lado derecho.



Figura 13. Preparación semipermanente de un colémbolo

7. Por último las preparaciones se colocaron en una estufa a una temperatura de 40 °C durante 4 días, con ello se buscó que el líquido de Hoyer se. Después se cubrió la orilla de los cubreobjetos con una densa capa de barniz y así se mantuvo la preparación semipermanentemente fija y por lo que al momento de su identificación no se movió ninguno de los cubreobjetos, esto se evitó sobre todo cuando se colocó aceite de inmersión.

2.3.3 Determinación Taxonómica

La determinación taxonómica se llevó a cabo con la ayuda del microscopio compuesto Olympus CH-B45-T-2. Para determinar el género se empleó el microscopio de contraste de fases Carl Zeiss Axiostar LR 113484 (con aceite de inmersión) y se recurrió al uso de las claves taxonómicas para la Identificación de algunos géneros de Collembola más comunes o presentes en México (modificada por Palacios, 1988). También se usaron las fotografías tomadas con las cámaras Samsung ES75 y Olympus SP57OUZ de los géneros identificados.



Figura 14. Determinación taxonómica de *Orchesella bifasciata*

2.3.4 Determinación molecular (Secuencia)

Los hexápodos fueron mantenidos en botes de plástico con un fondo de yeso humedecido y un papel filtro por 24 horas a una temperatura de 20 °C. Los colémbolos fueron alimentados con levadura de cerveza. En la extracción los hexápodos fueron colocados al frío a una temperatura -10 °C y posteriormente introducidos en alcohol al 70%. Para este trabajo la determinación molecular se realizó directamente mediante la secuenciación del gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (CO II).

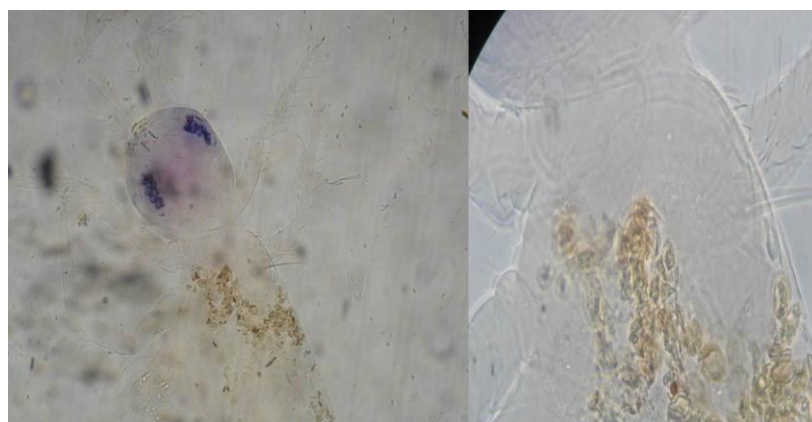


Figura 15. Preparaciones semipermanentes de colémbolos, con el tracto digestivo lleno y esporas en el exoesqueleto

2.3.5 Determinación de las estructuras de los hongos (micelio, ascas, conidios) presentes en el tracto de digestivo de *O. bifasciata*

Procedimiento

- Una vez listas las preparaciones, se llevaron al microscopio compuesto Olympus y se procedió a la determinación de las estructuras fúngicas.
- Se observó el tracto digestivo a 40X y la identificación se determinó en base al desarrollo de esporas como se describe en las claves de Barnett y Hunter (1998).

Aislamiento y purificación de las estructuras fúngicas presentes en el exoesqueleto de *O. bifasciata*

Tratamiento 1 (Colémbolos sin desinfestación)

Procedimiento

- En cajas Petri de 6 cm de diámetro con medio de cultivo PDA + antibiótico (Ácido Láctico al 25%).
- Se colocaron tres colémbolos en estado de letargo por caja Petri; los cuales estuvieron en ayuno.
- Los hexápodos se pusieron sobre la superficie del medio de cultivo.
- Las cajas Petri fueron selladas con parafilm.

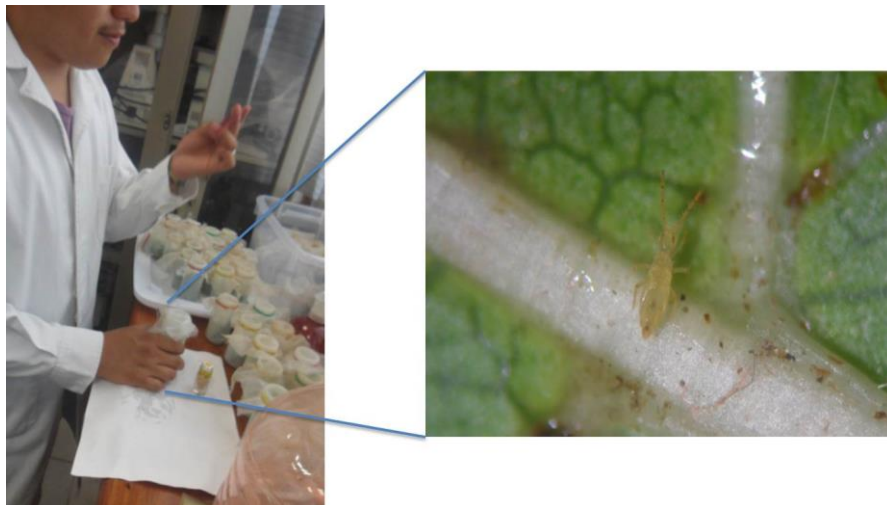


Figura 16. Ejemplar de *Orchesella bifasciata* en ayuno.

TRATAMIENTO 2 (Colémbolos Desinfestados)

PROCEDIMIENTO

- a. Los colémbolos fueron puestos en varias soluciones iniciando por un minuto en alcohol al 70%, posteriormente se colocó 60 segundos en agua destilada con hipoclorito de sodio al 5%, seguido de dos lavados en agua destilada estéril por 30 segundos cada uno.
- b. Al término de estos tratamientos se secaron los colémbolos en papel absorbente estéril.
- c. Los hexápodos fueron transferidos en cajas de Petri de 12 cm de diámetro con medio de cultivo PDA + antibiótico (Ácido Láctico al 25%) y se colocaron sobre la superficie del medio.
- d. Las cajas fueron selladas con parafilm estéril.



Figura 17. Ejemplares de *Orchesella bifasciata* colocados en solución

TRATAMIENTO 3 (Colémbolos desinfectados y squash)

PROCEDIMIENTO

- a. Los colémbolos fueron colectados directamente en agua destilada estéril, con el fin de que pudiesen germinar las estructuras fúngicas presentes en el tracto digestivo.
- b. Los hexápodos fueron puestos en varias soluciones iniciando un minuto en alcohol al 70%, posteriormente se colocaron 60 segundos en hipoclorito de sodio al 5%, seguido de dos lavados en agua destilada estéril por 30 segundos cada uno.

- c. Con la ayuda de una pequeña espátula estéril fueron colocados en papel filtro para retirarle el exceso de agua destilada.
- d. En cajas de Petri de 12 cm de diámetro con medio de cultivo de Papa Dextrosa Agar (PDA) + antibiótico (Ácido Láctico al 85%), se realizaron cuatro orificios con un sacabocados en el medio de cultivo, y mediante el uso de una aguja estéril fueron levantados cada bocado para dejar los orificios expuestos.
- e. Dos colémbolos fueron transferidos a cada orificio, dando un total de 8 colémbolos por caja Petri, y con la aguja estéril se realizó una pequeña perforación en el abdomen de cada hexápodo para así poder liberar el contenido intestinal, los bocados fueron puestos en los orificios.
- f. La caja Petri se selló con parafilm para evitar que el medio se contaminara y se desarrollaran otros hongos contaminantes.



Figura 18. Colémbolos tratados y realización de los bocados en las cajas Petri receptoras

TRATAMIENTO 4 (Colémbolos vivos y squash) PRUEBA SUGERIDA

PROCEDIMIENTO

1. De los ejemplares de *O. bifasciata* colectados previamente, se seleccionaron aquellos que presentaron el tracto digestivo lleno y esto se realizó observándolos detalladamente en el microscopio estereoscópico (modelo), el indicador fue una pequeña franja longitudinal de color café a la altura del abdomen.

2. Se colocó 3 individuos vivos por cada caja Petri con el tracto digestivo lleno, se formó un triángulo en la caja Petri de 10 cm de diámetro.
3. Posteriormente se agregó el medio de cultivo PDA + Ácido Láctico al 85% + Streptomina, (en una proporción de 39 gr de PDA por litro de agua destilada estéril + 2 gotas de ácido láctico al 85% por 100 mL de medio de cultivo + 5 ug de estreptomicina por mL de medio), el medio fue vaciado a una temperatura de 35°C, lo anterior se realizó con la finalidad de no dañar las estructuras fúngicas.
4. Se marcó con una cruz en donde habían sido macerados los colémbolos, cada caja Petri se etiquetó con los datos correspondientes al sitio de colecta así como la fecha y el cultivo en el que se colectó la muestra.
5. Por último se selló la caja con parafilm y se colocaron las cajas Petri a una temperatura de 20°C para favorecer el desarrollo y esporulación de los hongos.

2.3.6 Purificación de hongos del tracto digestivo y exoesqueleto de *O. Bifasciata*

Una vez obtenidos los crecimientos miceliares tanto de los tractos digestivos como del exoesqueleto de *O. bifasciata* sometido a las pruebas de germinación, estos fueron aislados para determinar su género, el procedimiento fue el siguiente:

- a. En una campana de flujo laminar se retiró el parafilm a las cajas Petri con los hongos desarrollados, se utilizó una lámpara de alcohol.
- b. Se cortó un pequeño fragmento de agar, donde se encontraba el hongo a aislar.
- c. Se transfirió el pedazo de agar a una nueva caja Petri con medio de cultivo PDA + estreptomicina + ácido láctico al 85%.
- d. Otra forma de aislar hongos que presentaron mucha esporulación fue tomando con la aguja de disección estéril una punta de la hifa, la cual se

transfirió a una caja Petri con medio de cultivo en donde solamente la aguja con el hongo pasaron por la superficie del medio.

- e. Todas las cajas Petri fueron selladas con parafilm y fueron incubadas a una temperatura de 22 a 25 °C.



Figura 19. Aislamiento de hongos del tracto digestivo

2.3.7 Determinación taxonómica de los hongos purificados del tracto digestivo y exoesqueleto de *O. bifasciata*

MÉTODOS Y USO DE CLAVES

DETERMINACIÓN DE LOS HONGOS AISLADOS

- a. Cuando los hongos presentaron un desarrollo visible, se procedió a realizar preparaciones temporales en lactofenol y glicerina.
- b. Se abrieron cuidadosamente las cepas purificadas, retirándoles lentamente el parafilm que mantenía sellada a las cajas.
- c. Se tomó una pequeña porción del micelio, o estructura del hongo.
- d. Se colocó una gota de lactofenol, sobre el centro de un portaobjetos y ahí mismo se puso la porción del hongo aislado, adicionando un cubreobjetos.

- e. Se limpió el exceso de lactofenol y se observó al microscopio compuesto a 40x.
- f. La identificación de los géneros se hizo a través de las Claves de Barnett y Hunter para Ascomycetos.

AISLAMIENTO DE MATERIAL VEGETATIVO CON SÍNTOMAS DE HONGOS

El material vegetal se almacena en refrigeración a una temperatura de 3 °C.



Figura 20. Conservación del material vegetativo con síntomas de hongos

Aislamiento de hongos

1. Se cortaron pequeños trozos de tejido enfermo de las muestras que presentaron lesiones angulares y bien desarrolladas, se utilizó una tijera estéril.
2. Los trocitos se desinfectaron durante 3 minutos en una caja Petri de 60 mm con hipoclorito de sodio al 3%, posteriormente se lavaron por un minuto en agua destilada estéril en otra caja Petri, esto se realizó 3 veces vertiendo el agua sobre la muestra con la ayuda de una pipeta estéril.
3. Los trocitos lavados se colocaron sobre el papel absorbente estéril durante 5 minutos y de esta forma se eliminó el exceso de humedad.

4. Cuando las muestras se secaron completamente, estas fueron tomadas con una pinza estéril y transferidas a cajas Petri con medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) y se colocaron tres pedacitos de hoja por caja. Las cajas fueron incubadas a una temperatura de 20 °C durante 10 días.
5. Al término de ese tiempo, el hongo produjo estructuras reproductivas.

Purificación

La purificación de los aislados se realizó mediante la técnica de cultivos monospóricos.

Procedimiento

1. Se purificó el hongo a partir del crecimiento en medio de cultivo de PDA + ácido láctico (6 gotas L-1), el tejido enfermo que fue sembrado en medio de PDA se observó con un microscopio estereoscópico y así se identificó las estructuras desarrolladas tales como conidios y ascosporas. Con la ayuda de un alfiler entomológico estéril se tocó ligeramente la masa de conidios y ascosporas elegidas con el fin que quedaran adheridos a la punta del alfiler.
2. En una caja Petri con medio de cultivo PDA se introdujo suavemente la punta del alfiler que contenía los conidios de tal manera que se impregnaran en el medio.
3. Posteriormente las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 20°C durante 24 horas, para que los conidios y ascosporas germinaran.
4. Al germinar las estructuras se les observó con un microscopio estereoscópico, se eligió una y se tomó con un alfiler entomológico estéril y se volvió a transferir a una caja Petri con medio de cultivo PDA y se incubó la caja a 20°C de temperatura; después de 12 días, el medio quedó cubierto en su totalidad por estructuras del hongo.



Figura 21. Purificación de hongos fitopatógenos

Determinación taxonómica (Métodos y claves utilizadas)

Procedimiento

1. Para la determinación taxonómica se realizaron observaciones para cada colonia que creció en medio de cultivo PDA, se tomó en cuenta la forma del crecimiento, coloración, y presencia de estructuras reproductivas (Lezcano *et al.*, 2010).
2. Para la caracterización morfológica, se realizaron preparaciones de las estructuras de reproducción en lactofenol, las cuales se analizaron en un microscopio compuesto Olympus CH-BI45-T-2 a 40X, y en algunos casos a 100X con aceite de inmersión.
3. La identificación de los hongos a nivel de género se realizó con las claves especializadas de Barnett y Hunter (2006), mientras que la identificación de la especie se llevó a cabo usando las descripciones y claves de Sutton (1980), Leslie y Summerell, (2006), Simmons (2007).

2.3.8 Preferencia alimenticia de *O. bifasciata*, sobre hongos fitopatógenos

MANEJO DE EJEMPLARES

Se utilizó la técnica 2 de colecta para la obtención de colémbolos, los frascos fueron sacados de la hielera y se colocaron en un lugar con mayor ventilación. Diariamente se les agregó agua destilada estéril en forma de microaspersión para mantener una humedad relativa del 90% y una temperatura de 25°C. Cada 5 días se le agregó levadura de cerveza a los frascos.



Figura 22. Alimentación de los especímenes de *Orchesella bifasciata*

AYUNO DE LOS ESPECIMENES

Los colémbolos con el tracto digestivo lleno:

- Fueron introducidos en un congelador a -10°C de temperatura por 30 minutos, esto se hizo con el fin de aletargarlos e inmovilizarlos.
- Después se extrajeron los colémbolos de los frascos sin dañarlos y se introdujeron en frascos que contenían una ligera capa de yeso húmeda de 10 mm de altura.
- El tiempo de ayuno fue de 48 horas, para que todo el contenido alimenticio fuera digerido por sus enzimas.

- d. Cada 12 horas, se agregó agua destilada en forma de microaspersión con la ayuda de un atomizador para mantener la humedad relativa del medio al 90%.

PREPARACIÓN DE MEDIOS RECEPTORES

PROCEDIMIENTO:

- a. Se preparó medio de cultivo PDA en dosis de 39 gr. por litro de agua destilada + 2 gotas de ácido Láctico al 85%. Por 100 mL de medio de cultivo + 5 ug de estreptomicina por mL de medio. El cual fue vaciado en cantidad de 10 mL por caja Petri de 5 cm de diámetro.

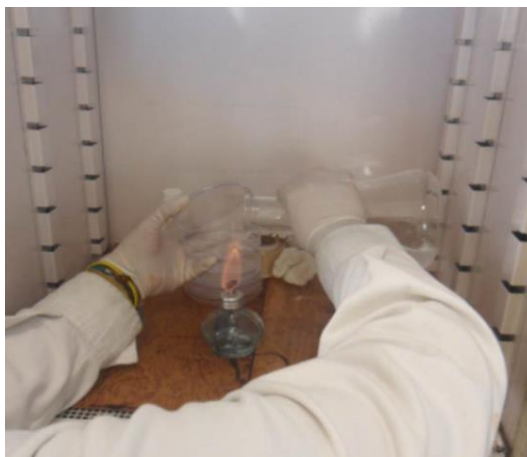


Figura 23. Vaciado de medio de cultivo PDA + ácido Láctico al 85% + estreptomicina

- b. Una vez solidificado el medio de cultivo y con la ayuda de un sacabocados de 10 mm de diámetro, se hicieron 4 orificios con 4 mm de altura al medio de cultivo nuevo en forma de un cuadrado, lo anterior se realizó para todas las cajas Petri receptoras del experimento.
- c. A su vez se realizó el mismo procedimiento pero con cepas de los hongos purificados y una vez obtenido el bocado, se transfirió al medio PDA + ácido láctico + estreptomicina procurando que se acoplaran bien en el medio receptor y que el hongo pudiera desarrollarse. Todo lo anterior se realizó en una campana de flujo laminar y detrás de una lámpara de alcohol para evitar la contaminación externa.

- d. Esto se realizó con 16 cepas que se utilizaron para las pruebas de preferencia con 4 repeticiones cada uno.
- e. Se dejó por 24 horas a los hongos transferidos en su nuevo medio.

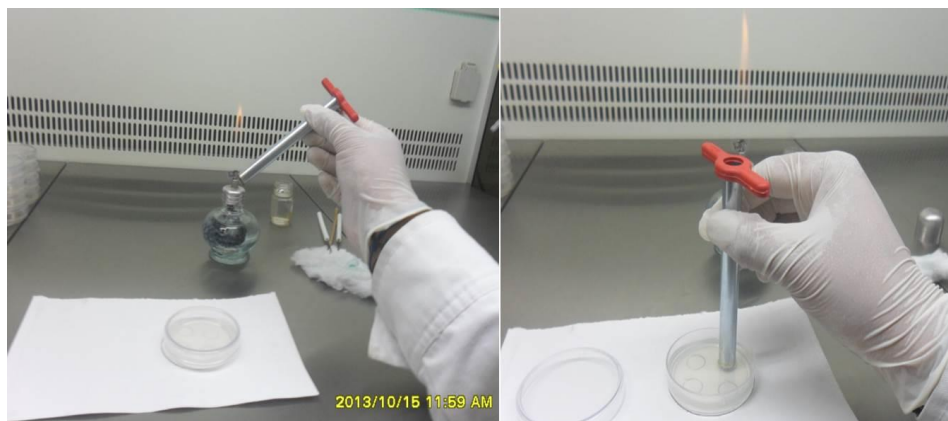


Figura 24. Preparación de medios receptores para las pruebas de preferencia



Figura 25. Transferencia del hongo a prueba a un medio de cultivo nuevo

Una vez obtenidos los individuos de *O. bifasciata* de las pruebas de ayuno:

- a. Los hexápodos puestos a ayuno fueron transferidos del frasco a una caja de Petri limpia y, mediante una espátula estéril se colocaron 5 individuos de *O. bifasciata* por caja Petri receptora.
- b. Por ultimo a las cajas Petri fueron selladas con parafilm, para evitar la contaminación externa.



Figura 26. Cajas Petri selladas con parafilm

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Determinación taxonómica

En todas las colectas realizadas, la especie más abundante fue *O. bifasciata*, colémbolos que principalmente se hallaron en el follaje de *J. curcas*, (dosel), en total se obtuvieron 5,555 individuos. Muchos de ellos murieron en el transporte debido a los cambios de hábitat, por lo que el número de hexápodos bajó considerablemente, otra cantidad de hexápodos se perdió durante el proceso de determinación taxonómica, molecular y al tiempo de llevar a cabo los tratamientos de germinación de estructuras fúngicas, algunos colémbolos se perdieron y otros se escaparon lo anterior debido a su tamaño pequeño y la presencia de su furcula.

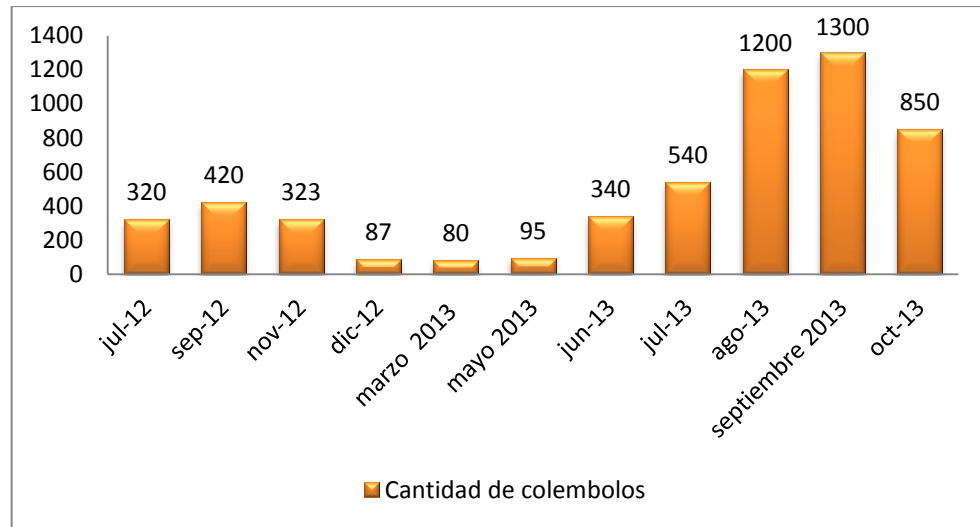


Figura 27. Descripción de los colémbolos colectados en años 2012 y 2013.

La determinación taxonómica de estos hexápodos es:

Reino: Animalia

Phyllum: Arthropoda

Orden: Collembola

Familia: Entomobrydae

Género: *Orchesella*

Especie: ***Orchesella bifasciata*** Bourlet



Figura 28. Preparación semipermanente de *Orchesella bifasciata* en liquido de Hoyer

Determinación molecular

El análisis molecular, realizado a los colémbolos genero la secuencia:

>ENA|CDG50499|CDG50499.1 Orchesella bifasciata partial cytochrome oxidase subunit 1 : Location:1.606

```
GTAGGTACAGCATTAGAGTATTAATCCGGCTAGAATTAGGACAACCAGGAAGTTTTATC
GGAGATGATCAAATTTATAATGTAATAGTTACAGCCCACGCTTTTATCATAATTTTTTTT
ATAGTTATACCTATCATAATTGGGGGGTTTGGAACTGATTAGTACCATTGATAATTGGA
GCCCCTGATATAGCTTTCCACGAATAAATAATATAAGTTTTTGATTGCTTCCCCCTTCA
TTAACATTATTATTGGCAGGAGGTTTAGTAGAAAGAGGGGCAGGAACGGGATGAACAGTT
TACCCTCCCTTAGCCGCCGGAATTGCACACGCTGGGGCTTCTGTTGATCTATCAATTTTT
AGTCTTCATTTGGCAGGAGCCTCTTCAATTTTAGGCGCTGTAAATTTTATTACTACTATC
ATCAATATGCGATCCCCCGGCATATCTTGAGATCAAACACCTCTTTTTGTTTGATCAGTC
TTCCTAACTGCTATTTTATTATTACTACTACCTGTTCTTGCAGGTGCCATCACTATA
CTACTTACAGACCGTAATTTAAATACTTCGTTTTTCGATCCTGCGGGGGGTGGAGACCCT
ATCTTA
```

Dando como resultado la determinación del colémbolo:

ORGANISMO

Eukaryota

Metazoa

Ecdysozoa

Arthropoda

Hexapoda

Collembola;

Entomobryomorpha

Entomobryoidea

Entomobryidae

Orchesellinae;

Orchesella.

Orchesella bifasciata

El análisis molecular ha tomado mucha importancia hoy en día ya que se basa principalmente en analizar las secuencias de nucleótidos de un fragmento de ADN. El resultado obtenido del análisis molecular coincide con la determinación taxonómica, con lo cual se pudo cerciorar que el colémbolo pertenece a la especie *Orchesella bifasciata*, descrita por Bourlet en 1839.

La secuencia del colémbolo estudiado se obtuvo mediante secuenciación del citocromo oxidasa de la subunidad 1, muestra que está registrada en las bases de datos del GenBank, con el número de acceso [HG422626.2](#) el cual indicó una similitud en un 100% con *Orchesella bifasciata*. Analizando dichos resultados

consideramos el análisis molecular como un método fiable ya que nos proporcionó certeza sobre la determinación (Frati, *et al* 1992). En el caso de especies pequeñas, los métodos moleculares toman mucha importancia ya que la determinación en base a claves taxonómicas, puede provocar algunos errores ya que en ocasiones, al momento de preparar la muestra ésta puede dañarse debido a que las partes del cuerpo del hexápodo pueden romperse o desintegrarse, y sin estas características morfológicas es muy complicado poder realizar una correcta determinación y esto incide de manera peligrosa debido a que el resultado puede ser dudoso.

Los agentes causales, asociados a las lesiones angulares fueron:

Cuadro 5. Hongos aislados del follaje de *Jatropha curcas* L. del sitio A “Chicuasencuautla”

Colecta y sitio	Material de aislamiento	Género o especie
Sitio A <i>Jatropha curcas</i> L.	Hojas del segundo tercio de la planta	<i>Chaetomium</i> sp.
		<i>Phoma</i> sp.
		<i>Fusarium verticiloides</i> (<i>Gibberella moniliformis</i>)
		<i>Fusarium</i> spp.
		<i>Fusarium oxysporum</i> cepa 1
		<i>Fusarium oxysporum</i> cepa 2
		<i>Phomopsis</i> sp.
		<i>Helminthosporium</i> sp.
		<i>Alternaria alternata</i> , 1
		<i>Alternaria alternata</i> , 2
		<i>Cladosporium</i> sp.
		<i>Trichoderma</i> sp. cepa 1
		<i>Trichoderma</i> sp. cepa 2
		<i>Aspergillus flavus</i>
		<i>Aspergillus niger</i>
		<i>Penicillium</i> sp.

Cuadro 6. Hongos aislados del follaje de *Jatropha curcas* L. del sitio B “Sta. Lucia”

Colecta y sitio	Material de aislamiento	Género o especie
Sitio B <i>Jatropha curcas</i> L.	Hojas del segundo tercio de la planta	<i>Chaetomium</i> sp.
		<i>Fusarium verticiloides</i> (<i>Gibberella moniliformis</i>)
		<i>Fusarium oxysporum</i> cepa 1
		<i>Helminthosporium</i> sp.
		<i>Alternaria alternata</i> , 1
		<i>Cladosporium</i> sp.
		<i>Trichoderma</i> sp., cepa 1
		<i>Penicillium</i> sp.

En los dos sitios de muestreo se presentaron una diversidad de hongos que en su mayoría son fitopatógenos y saprofitos.

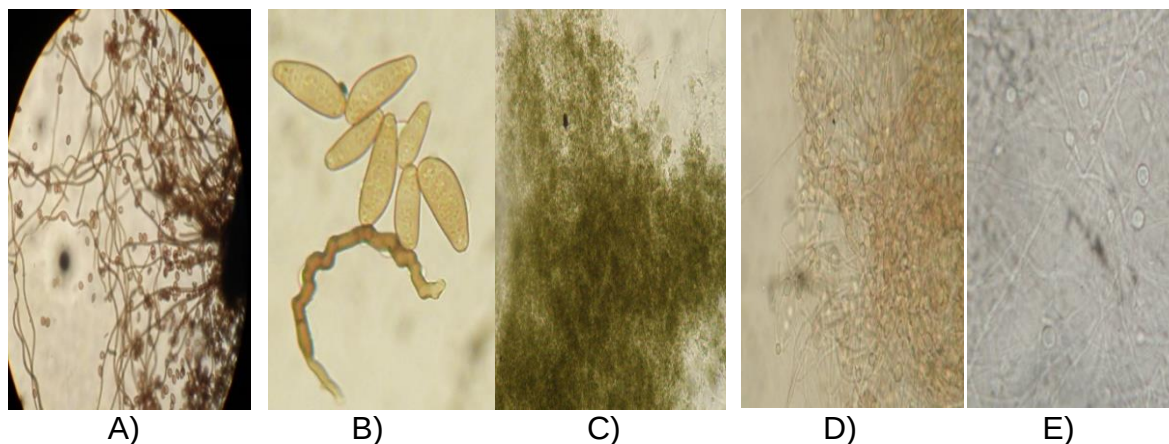


Figura 29. *Cladosporium* sp., (A) *Helminthosporium* sp., (B) *Penicillium* sp., (C) *Fusarium* sp., (D) y *Trichoderma* sp. (E)

De los agentes causales, aislados algunos coinciden con lo mencionado con Lozano (2007), Biocombustibles de Guatemala (2008) y Prihandana y Hendroko (2006) que en todos los países en donde se cultiva *J. curcas*, se presenta por lo regular *Fusarium* spp., *Helminthosporium*, *Alternaria* sp., los cuales se presentan como patógenos de elevada incidencia que atacan tallos y hojas.



Figura 30. *Fusarium oxysporum* cepa 1 (sitio A) *Fusarium oxysporum* cepa 2 (sitio B)

En el caso de *Fusarium* spp, Melo *et al.*, (2007), reportan que en las plantaciones de *J. curcas* se presenta una elevada incidencia del patógeno y más en lugares con clima semicálido y (Biocombustibles de Guatemala, 2008) con alta humedad (2000 mm anuales), ejemplo de ello es Xochitlán de Vicente Suarez, Puebla, en estos sitios se encontró que el patógeno (sitios de muestreo) ataca tallos y hojas de plantas jóvenes de *J. curcas*.

Además de todas las hojas procesadas se aislaron 16 especies fungosas, de entre las que destacan *Chaetomium* sp., *Fusarium verticiloides* (*Gibberella moniliformis*), *Fusarium oxysporum* cepa 1, *Helminthosporium* sp., *Alternaria alternata*, 1; *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp. cepa 1 y *Penicillium* sp., las cuales se encontraron en las dos parcelas experimentales.



Figura 31. *Phakopsora arthuriana* en *J. curcas*

También se tuvo la presencia de *Phakopsora arthuriana*, (Nolasco, 2011) (sin. *Phakopsora jatrophicola*) la cual es causante de roya en *J. curcas* (Gomes, 2009). Se estableció directamente en las hojas formando pústulas, lo que reduce la superficie fotosintética de la planta, (Andrade y Gabriel, 2008).

Este tipo de roya se distribuyó desde Brasil a diferentes partes del mundo incluido México, debido a la comercialización de estructuras reproductivas. Además la importancia fitosanitaria y económica de la roya en *J. curcas* en México, radica en los altos niveles de incidencia y severidad en los que puede presentarse cuando las condiciones ambientales son favorables, tal y como se observó en los sitios de muestreo de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla. Este municipio presenta un clima templado húmedo con lluvias todo el año, el cual favoreció el progreso de la enfermedad. En ambas plantaciones se observaron hojas con síntomas típicos de roya en una incidencia de 40-45%.



Figura 32. Daño producido por *Colletotrichum gleosporioides* (envés y haz)

Colletotrichum gleosporioides se aisló del sitio A, sin embargo se tuvo problemas al momento de purificarlo debido a una contaminación excesiva de ácaros, y no se volvió a encontrar en las colectas posteriores, por lo tanto no se consideró para las pruebas de preferencia alimenticia. Además éste patógeno ha sido reportado en el estado de Yucatán por Torres (2011), en plantaciones iniciales de *J. curcas*.

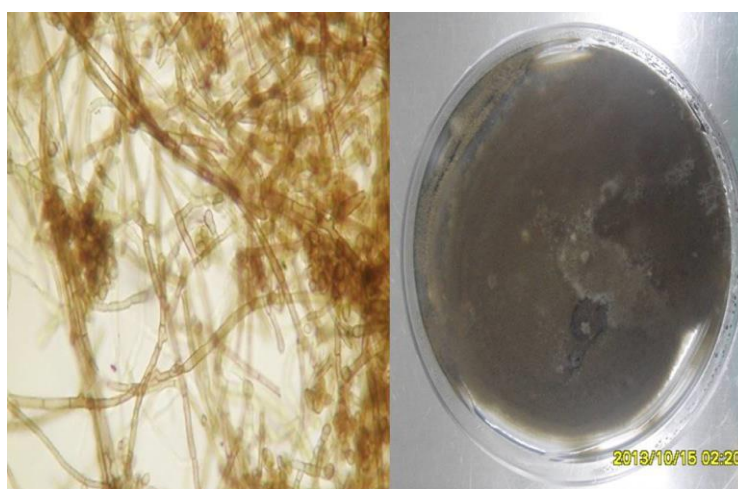


Figura 33. *Cladosporium* sp.

Cladosporium sp. fue la especie más abundante en el follaje de *J. curcas*, de ambos sitios experimentales. También se presentó en los aislamientos tanto del exoesqueleto y del tracto digestivo de *Orchesella bifasciata*. Por lo que se consideró a esta especie como muy abundante.

Se esperó la presencia de la enfermedad conocida como cenicilla, (*Oidium* sp.), ya que es un patógeno que ataca follaje, además de reducir la lámina foliar y presentarse en época de seca (Andrade y Gabriel, 2008).

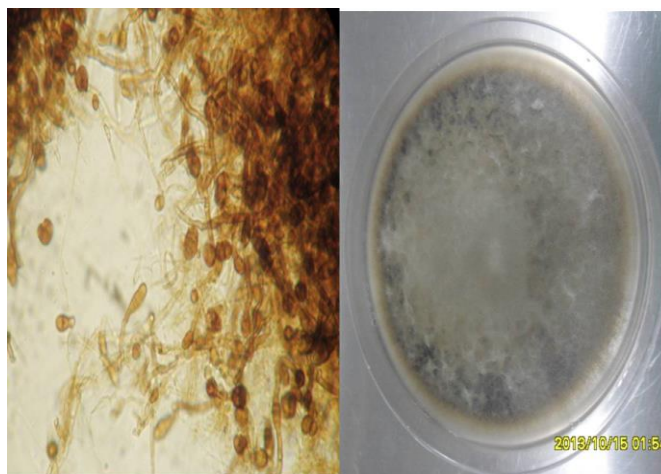


Figura 34. *Alternaria alternata*

Otro de los patógenos que se presentó en las parcelas experimentales fue: *Alternaria alternata*, el cual es causante de la caída de hojas de manera prematura, los daños causados se visualizan cuando empieza a ver una mancha, (Andrade y Gabriel, 2008). La presencia de este hongo se dio en todo el experimento, inclusive se observó en el exoesqueleto y en el tracto digestivo de *O. bifasciata*.

ASOCIACIÓN Y DETERMINACIÓN DE HONGOS PRESENTES EN EL EXOESQUELETO Y TRACTO DIGESTIVO DE *Orchesella bifasciata* Bourlet

Asociación de colémbolos y hongos

Al momento de la colecta de follaje, se observó la presencia de colémbolos en el envés de las hojas de *Jatropha curcas* L. y se encontró más individuos en aquellas hojas con mayor superficie foliar y mayor daño por hongos; en aquellas

hojas que presentaron menos daños por hongos se encontraron menor cantidad de individuos, es decir que puede existir una relación directa, entre la incidencia de hongos fitopatógenos y la presencia de colémbolos. Lo anterior se comprobó al momento de realizar preparaciones semipermanentes, ya que se observó en el tracto digestivo de los colémbolos una alimentación muy variada, (Saur 1988 y McMillan *et al.*, 1971). Se encontraron diversas estructuras fúngicas o bacterianas completas y (Rusek, 1998) fragmentos de esporas, así como micelio fragmentado. Lo que se observó se debe principalmente a que los colémbolos, presentan un conjunto de enzimas muy especializadas para su degradación, (Urbasek and Rusek, 1994), además son altamente especializados a la hora de elegir su alimento (Parkinson, 1983). En la colembolofauna predominan las especies micófagas (Mills y Sinha, 1971; Lartey *et al.*, 1989), lo cual se comprueba por Christiansen (1964) quien reporta que las especies del dosel se alimentan con más frecuencia de esporas de hongos que de fluidos bacterianos.

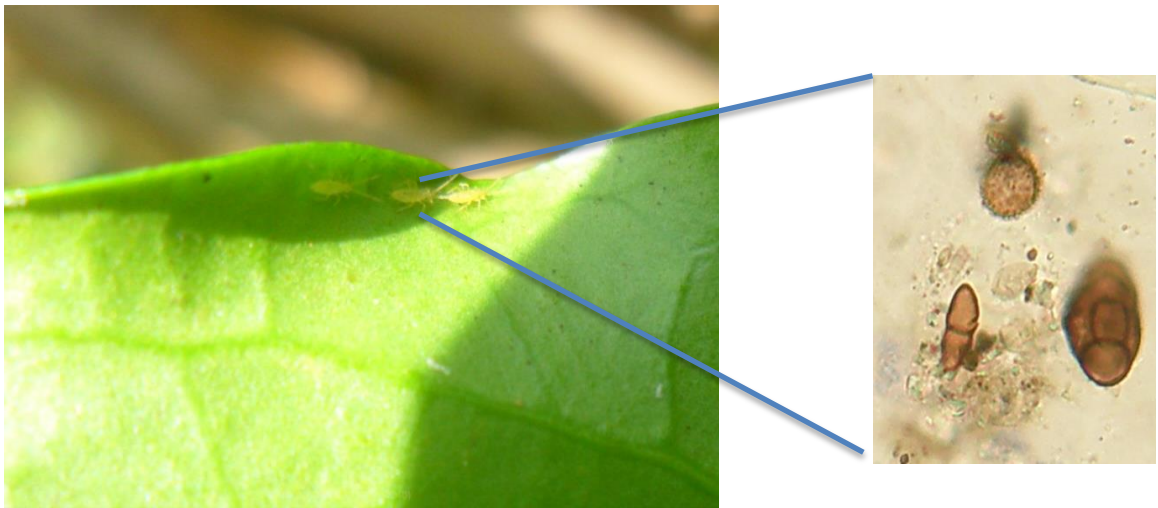


Figura 35. Asociación del tracto digestivo de *Orchesella bifasciata*, con hongos fitopatógenos.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTESTINAL DE *Orchesella bifasciata*, MEDIANTE PREPARACIONES SEMIPERMANENTES EN LÍQUIDO DE HOYER

Chicuasencuatla, Xóchitlán de Vicente Suarez, Puebla.

Se realizaron 76 preparaciones semipermanentes en líquido de Hoyer de los dos sitios de muestreo y las especies fúngicas encontradas fueron:

Del sitio A “Chicuasencuatla” se realizaron 44 preparaciones que corresponde a los meses de colecta julio, septiembre, noviembre de 2012 y junio de 2013, a continuación se muestran todas las estructuras y especies determinadas.

Se observaron estructuras tales como ascosporas, maduras e inmaduras, las cuales no pudieron ser determinadas a nivel de género, debido a que muchas de ellas estaban dañadas o incompletas, por lo tanto se mantuvieron con la categoría de Phyllo (Ascomyceto).

Del sitio B “Santa Lucia” se realizaron 32 preparaciones que corresponde a los meses de colecta julio, septiembre, noviembre de 2012 y junio de 2013

Todos estos registros son de los diversos hongos observados, en preparaciones semipermanentes en líquido de Hoyer, y con una visualización de 40X en el microscopio compuesto Olympus.

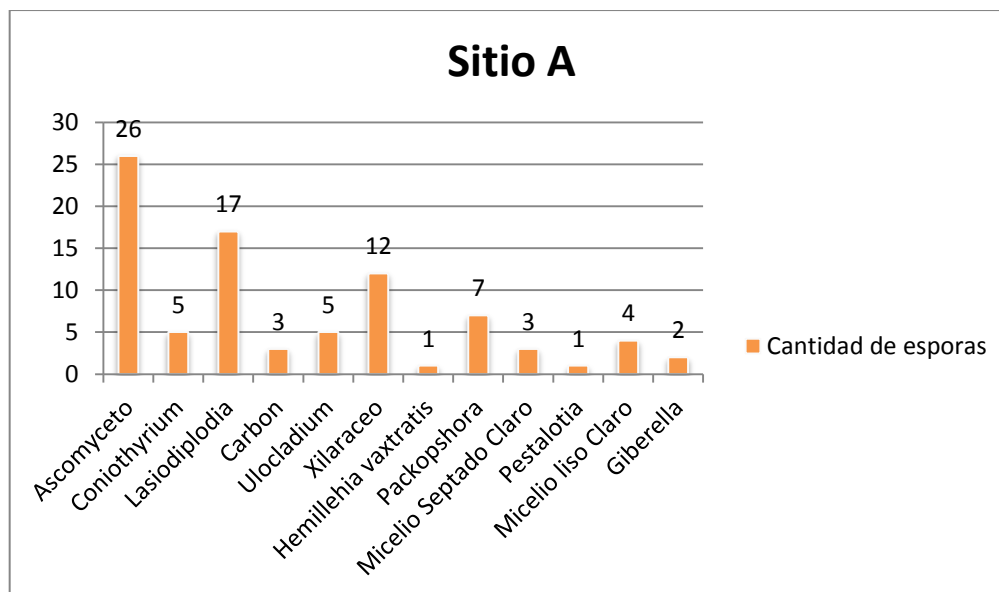


Figura 36. Cantidad de esporas determinadas en las preparaciones semipermantes en el sitio A

Los principales hongos encontrados en el sitio A fueron: *Coniothyrium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Packopshora* sp., *Xilaraceo* sp., ascosporas de ascomycetos y en menor proporción *Ulocladium* sp., *Hemillehia vaxtratis*, *Giberella* sp.

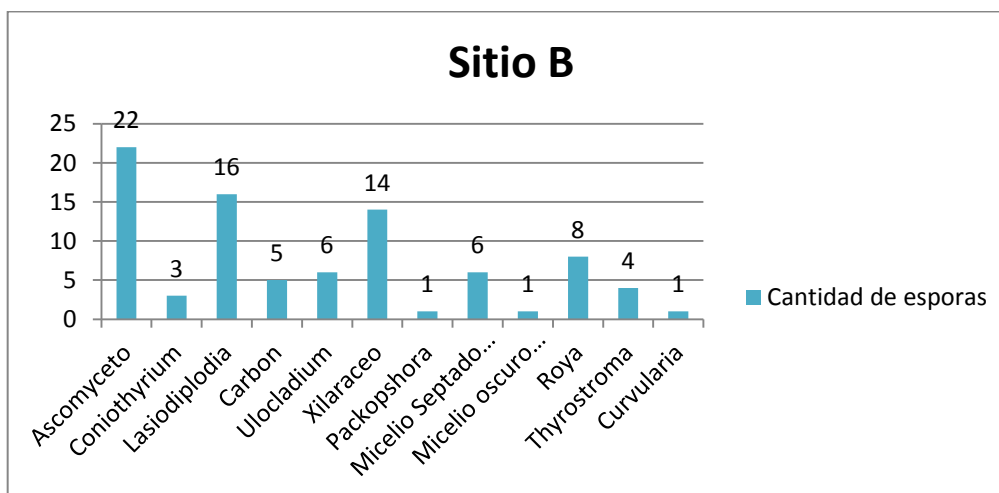


Figura 37. Cantidad de esporas determinadas en las preparaciones semipermantes en el sitio A

Las principales especies fúngicas encontradas en las preparaciones del sitio B, *Coniothyrium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Xilaraceo* sp., *Thyrostroma* sp., *Ulocladium*

sp., ascosporas de ascomycetos y en menor proporción *Giberella* sp., *Curvularia* sp.

Como podemos ver en las figuras 35 36, los colémbolos presentaron una ligera variación en cuanto a preferencia de estructuras fúngicas, ya que en casi todos los tractos digestivos analizados de ambos sitios de colecta, tuvieron una preferencia hacia los hongos *Coniothyrium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Xylaraceo* sp., lo que nos indica que *O. bifasciata* no solo se alimentó de un tipo de esporas, sino de tres principales especies las cuales pueden ser muy palatables para los colémbolos. Lo anterior nos demuestra que los colémbolos fueron muy selectivos al momento de alimentarse sin embargo, con este análisis de visualización no se demostró que exista una especie de hongos en particular sobre los demás hongos (Bardgett *et al.*, 1993). En cada tracto digestivo visualizado observó una gran cantidad de esporas dañadas, (Urbasek and Rusek, 1994) que pertenecen a diferentes especies.

Según lo reportado por Bardgett *et al.*, (1993) Hopkin, (1997) y Rusek (1998), los colémbolos prefieren consumir a los hongos saprofitos sobre otros tipos de hongos, sin embargo podemos observar que en los resultados del análisis de los tractos digestivos se apreció que los colémbolos se alimentaron de hongos fitoparásitos, y en gran medida dependen mucho de esas fuentes de alimento debido a que viven en el dosel, por lo que su alimentación influye en el comportamiento de los hongos que viven en el mismo follaje (Parkinson *et al.*, 1979 , Newell, 1984, Klironomos *et al.*, 1992).

En el caso de colémbolos edáficos, la búsqueda de su alimento se ve limitada por las características estructurales del suelo siendo una de estas los espacios porosos, con lo que se ofrece mayor oportunidad a los hongos saprofitos que a los fitopatógenos (Larsen *et al.*, 2004 ; Schrader y Lingnau , 1997). En nuestro caso, al encontrarse los colémbolos en el follaje no existen esas barreras físicas que les impida degustar las esporulaciones de los hongos fitopatógenos, las cuales según Wiggins y Curl., (1979) Curl *et al.*, (1988) Innocenti *et al.*, (1997) pueden ser aceptables por la aportación de Nitrógeno Shaw (1988), aunque

también hay factores químicos que pueden influir en la elección del alimento, como son la riqueza de nutrientes del micelio y los metabolitos secundarios tóxicos repulsivos.

DETERMINACIÓN DE HONGOS AISLADOS DEL EXOESQUELETO DE *Orchesella bifasciata*

En el tratamiento 1 (**Colémbolos sin desinfestación**), se presentaron todos los aislamientos realizados del exoesqueleto de los colémbolos, colectados en ambos sitios.

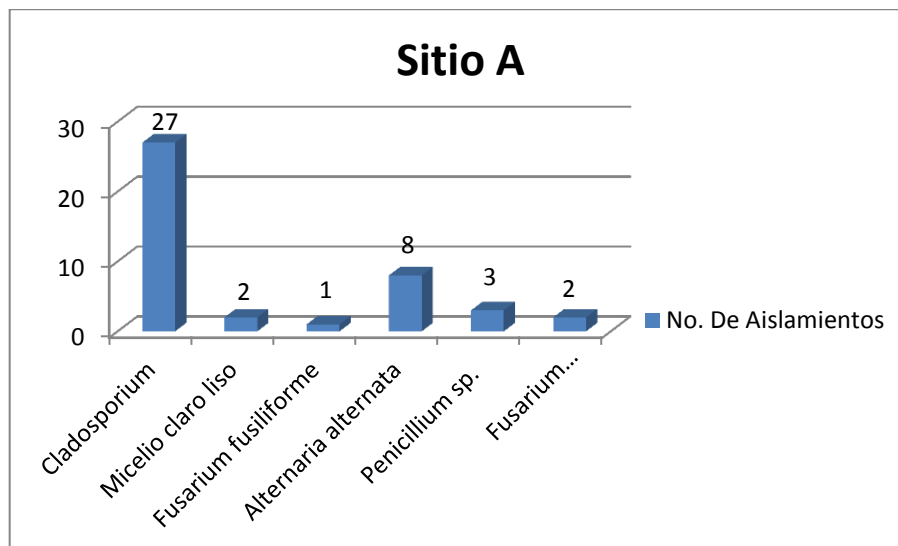


Figura 38. Total de aislamientos fúngicos del sitio A

Con lo cual tenemos que para el sitio A, las especies predominantes fueron: *Cladosporium* sp. , *Alternaria alternata*, *Fusarium* spp., y con menor incidencia *Penicillium* sp.

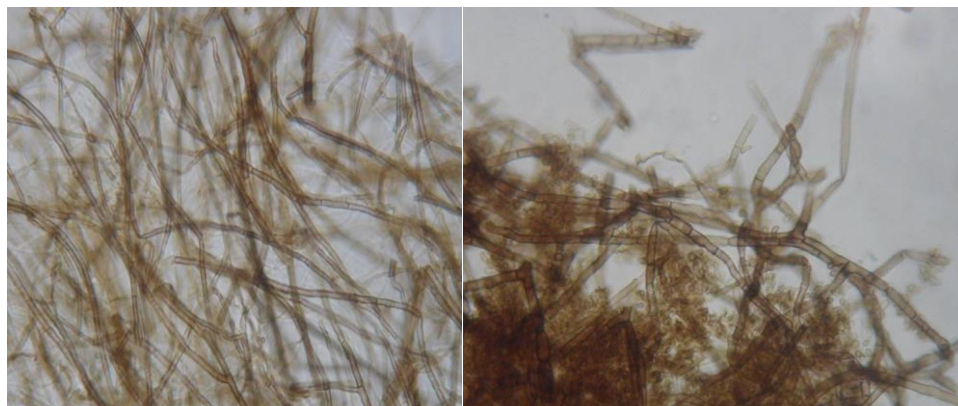


Figura 39. *Cladosporium* sp. (*Jatropha curcas*)

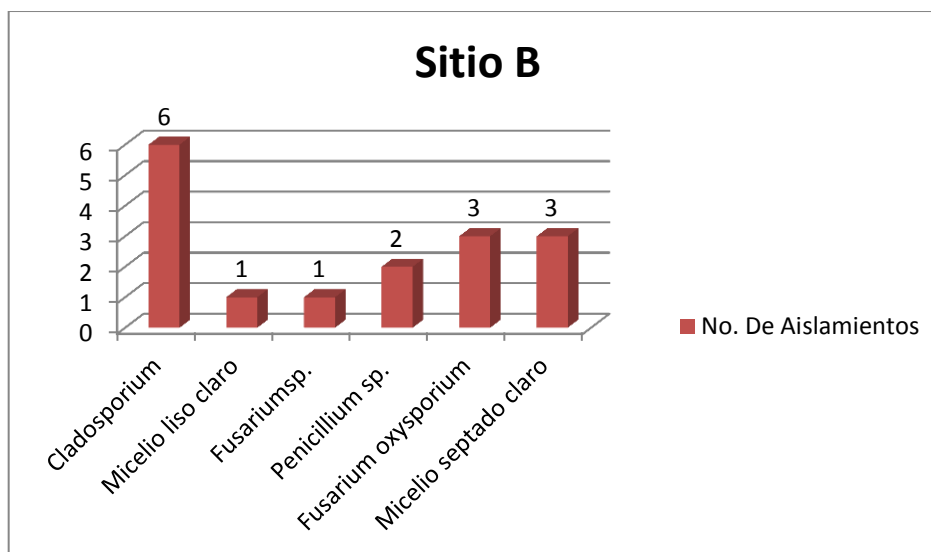


Figura 40. Total de aislamientos fúngicos del sitio B

Para el sitio B, las especies con más incidencia fueron: *Cladosporium* sp., *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp.

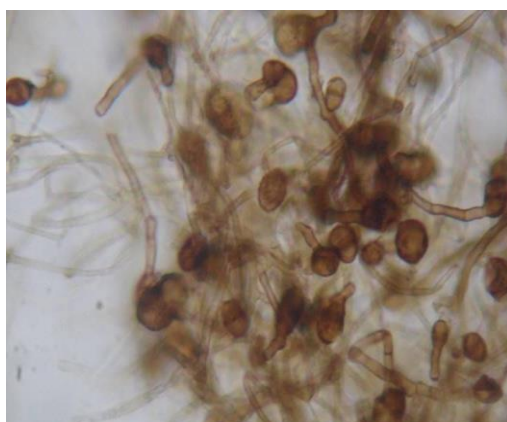


Figura 41. *Alternaria alternata*

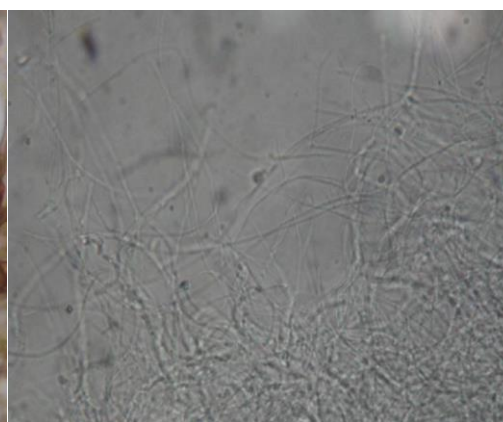


Figura 42. *Fusarium* sp. (*Jatropha curcas*)

Para el sitio B, las especies con más incidencia fueron: *Cladosporium* sp., *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp.

La germinación de estructuras fúngicas se debió principalmente a que los medios de Papa Dextrosa Agar (PDA), en donde se desarrollaron los hongos son muy sensibles debido a la alta concentración de nutrientes, ya que se necesitó de pocas esporas viables para que se desarrollara una colonia completa.

Los colémbolos son morfológicamente y ecológicamente diferentes en sus hábitos alimenticios. Ellos reconocen, con las diferentes partes de su aparato bucal el alimento a digerir. En el caso de la especie *Micranurida* se alimenta principalmente de bacterias, levaduras y otros microorganismos de los fluidos de fermentación y las películas de agua (Rusek, 1998).

Con *Orchesella bifasciata* pasa algo similar que con *Micranurida*, ya que también presenta un aparato bucal con mandíbulas y maxilas, con una placa molar como la de la familia Hypogastruridae (Greenslade *et al.*, 2002), las cuales son de gran ayuda al momento de alimentarse de crecimientos miceliares, lo anterior corresponde con lo que menciona Wolter (1963) que los hábitos de alimentación se pueden reconocer gracias a la morfología de las estructuras de su aparato bucal, así como el análisis del contenido intestinal (Rusek, 1985).

Las diferencias en las piezas bucales de los colémbolos pueden reducir la competencia entre diferentes tipos de especies ya sean, edáficos, euedáficos o de dosel, ya que debido a eso se pueden alimentar de diferentes recursos (esporas de hongos, bacterias, restos vegetales, minerales, algas) (Vegter, 1983; Chen *et al.*, 1997).

Cuando los colémbolos se alimentaron de los crecimientos miceliares en el follaje no sólo lo hicieron de esporas, sino también adquirieron esporas de la cutícula, principalmente en los apéndices locomotores (tarsos y uñas) como parte del tórax que es una zona con mucha vellosidad, e incluso también en la furcula ya que éste apéndice les sirve para saltar y por lo tanto pudieron apoyarse en un crecimiento micelial y llevarse consigo pequeños propágulos.

Sin embargo Sabatini e Innocenti, (2001) mencionan que la cantidad de propágulos viables transportados por colémbolos en su cutícula, de una planta a otra probablemente es insuficiente o no presenta la concentración necesaria de esporas infectivas para producir una enfermedad.

En el tratamiento 2 (**Colémbolos desinfestados**), los aislamientos obtenidos en ambos sitios están reportados en los Cuadros 7 y 8.

Cuadro 7. Total de aislamientos obtenidos del sito A

SITIO "A" 22-JUNIO-13 <i>Jatropha curcas</i> L.	AISLAMIENTOS	ESPECIE
	A1	<i>Cladosporium</i>
	A2	<i>Micelio claro liso</i>
	A3	<i>Chaetomium</i>
	B1	<i>Cladosporium</i>
	B2	<i>Penicillium</i>
	C1	<i>Cladosporium</i>
	C2	<i>Micelio claro liso</i>
	D1	<i>Cladosporium</i>
	D2	<i>Micelio claro liso</i>
	D3	<i>Chaetomium</i>
	E1	<i>Micelio claro liso</i>

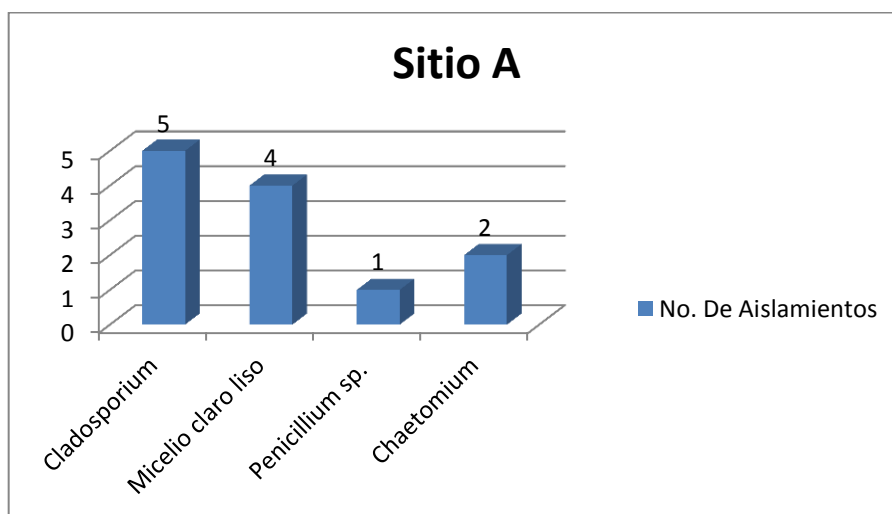


Figura 43. Total de aislamientos fúngicos del sitio A

Para el sitio A, las especies con mayor presencia fueron: *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Micelio claro liso*

Cuadro 8. Total de aislamientos obtenidos del sitio B

SITIO "B" 22-JUNIO-13 <i>Jatropha</i> <i>curcas</i> L.	AISLAMIENTOS	ESPECIE
	A1	<i>Fusarium fusiliforme</i>
	A2	<i>Pseudoplea briossione</i>
	A3	<i>Fusarium oxysporium</i>
	B1	<i>Cladosporium</i>
	B2	<i>Alternario alternata</i>
	C1	No se desarrolló nada

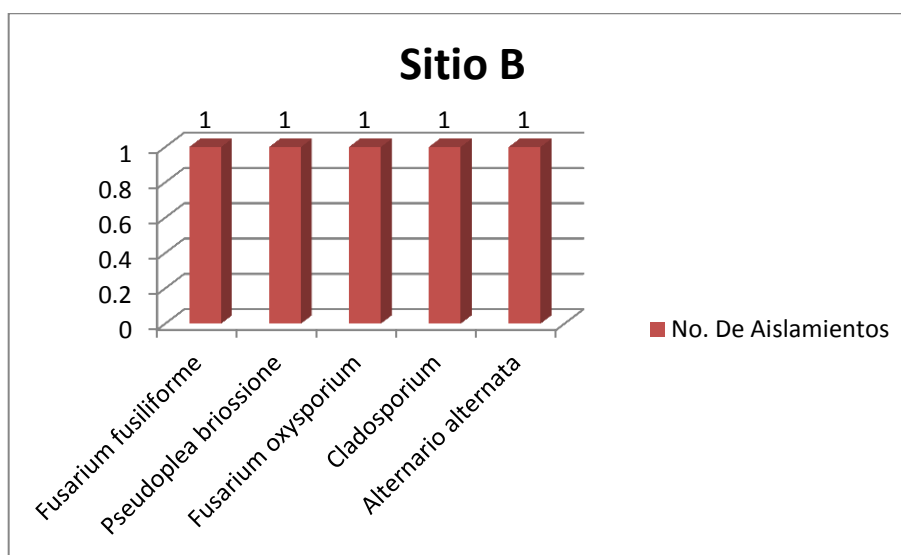


Figura 44. Total de aislamientos fúngicos del sitio B

Para el sitio B, las especies con mayor presencia fueron: *Fusarium oxysporium*, *Pseudoplea briossione*, *Alternario alternata*, *Cladosporium* sp.

Los resultados indican que son pocos los hongos que sobreviven a la exposición de los tratamientos, ya que fueron solo siete especies fúngicas (*Cladosporium*, *Chaetomium*, *Fusarium oxysporium*, *Pseudoplea briossione*, *Alternario alternata*, Micelio claro liso) que germinaron en medio de cultivo PDA.

Se realizaron varias repeticiones en las cuales, se trataba a los colémbolos en hipoclorito de sodio y posterior a ello enjuagues de agua destilada estéril.

Solo las esporas de *Cladosporium* sp., pudieron germinar, y estas provenían de los dos sitios de muestreo. La germinación de algunas esporas se debió, quizá a que se necesitaba más tiempo en los tratamientos a los cuales fueron expuestos los colémbolos.

Sin embargo muchas de las esporas encontradas en el exoesqueleto fueron inactivadas, es decir sufrieron un daño, quizá se deba al hecho de que los colémbolos fueron expuestos al hipoclorito de sodio 3%, lo cual afectó la viabilidad de las esporas, se intentó rescatarlas cuando se lavó con agua bidiestilada pero y las esporas ya no estaban vivas.

Lo que podemos verificar es que solo 7 tipos de esporas pudieron soportar la actividad del hipoclorito de sodio (degradación de las membranas lipoproteicas), sin embargo cuando se expusieron los colémbolos al medio de cultivo, estos pudieron germinar lo que demuestra que para las esporas es muy resistentes.

Sabatini e Innocenti, (2001) mencionan que la cantidad de estructuras fúngicas transportadas por los colémbolos que adquieren al momento de alimentarse de un crecimiento micelial, no presentan la concentración infectiva para producir una enfermedad, sin embargo estas esporas que sobrevivieron a los tratamientos se pudieron desarrollar en medios de cultivo (PDA). Tal vez se deba a que las esporas presentaron una pared muy gruesa y por lo tanto el hipoclorito de sodio no las afectó.

Determinación de hongos aislados del tracto digestivo de *Orchesella bifasciata*

En el tratamiento 3 (**Colémbolos desinfestados y squash**), se presentan los aislamientos obtenidos de la germinación de las estructuras presentes en el tracto digestivo de los colémbolos de los dos sitios de muestreo.

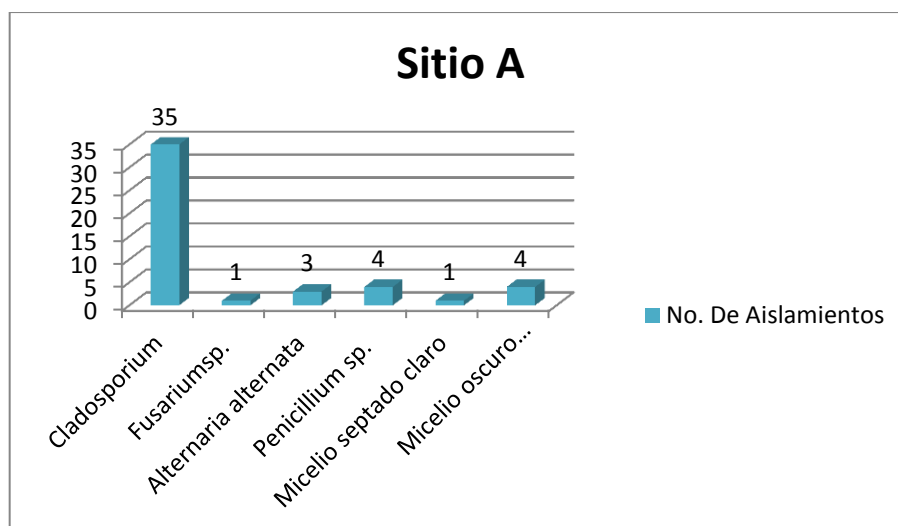


Figura 45. Total de aislamientos obtenidos del sitio A

Para el sitio A, las especies con mayor presencia fueron: *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., en poca incidencia se encuentran: *Fusarium*, *Alternaria alternata*

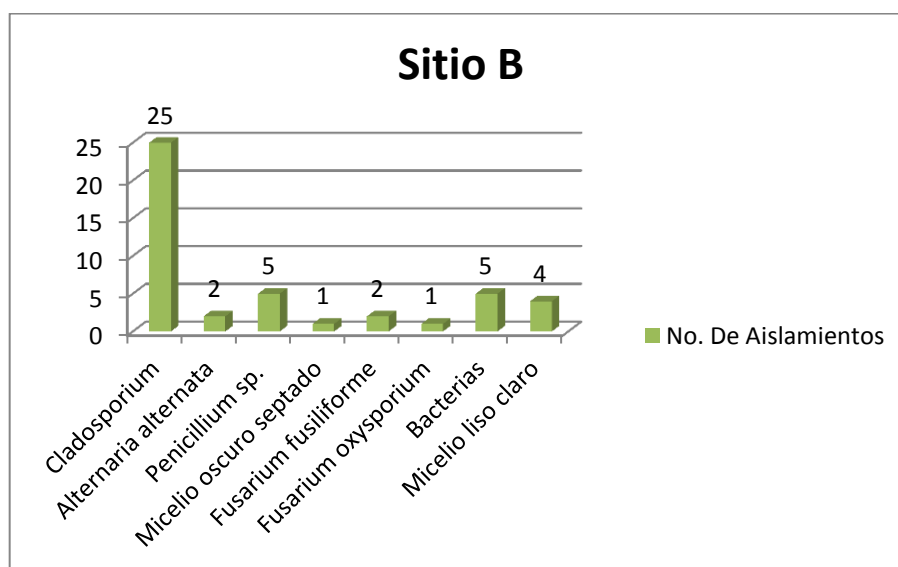


Figura 46. Total de aislamientos obtenidos del sitio B

Para el sitio B, las especies con mayor presencia fueron: *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. y con poca incidencia *Alternaria alternata*.

Los resultados indican que las especies con mayor germinación en los medios de cultivo fueron: *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., los cuales se presentaron en colémbolos provenientes de los dos sitios de muestreo, y las especies con

menor germinación pero que también se presentaron en ambos sitios de muestreo fueron: *Fusarium* spp., *Alternaria alternata*.

Muchas de las estructuras que se observaron en el tracto digestivo, y que no germinaron en el medio de cultivo, debido principalmente a lo reportado por Moody *et al.*, (1996). Moody informa que la germinación de esporas de hongos se reduce considerablemente debido a la exposición a los fluidos intestinales, es decir que es un medio hostil para las estructuras fúngicas (Warnock *et al.*, 1982) debido a las diferentes actividades de las enzimas amilasas, que pueden actuar varias veces en los hongos, y por lo tanto afectar de una manera muy severa a las esporas, las cuales salen inactivas con las heces fecales

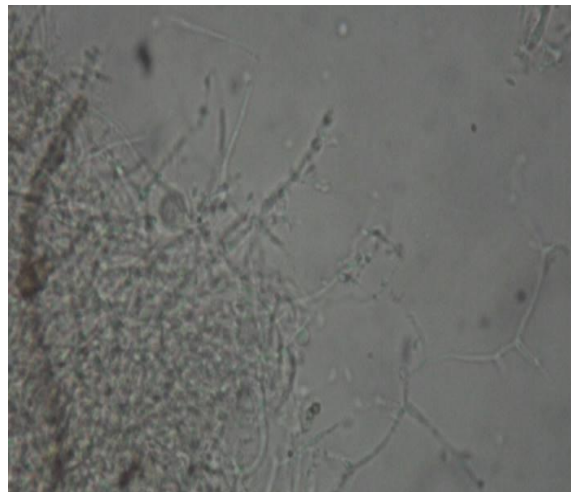


Figura 47. *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum, *Fusarium fusiforme*, solo se presentaron eventualmente en los aislados del sitio b, el primero en 3 aislamientos y el segundo solo en 2. Para el caso de *Fusarium* sp., que se presentó en ambos sitios de muestreo pero en solo 2 aislamientos, que se debió principalmente a lo expuesto por Urbasek y Rusek, (1994) quienes mencionan que, cuando *Fusarium culmorum* ingresa en el tracto digestivo de un colémbolo la mayoría de conidios son dañados careciendo de contenido citoplasmático y, es así como los heces fecales producidos por la alimentación de *F. culmorum* presentan casi todos los conidios fragmentados, por lo tanto las heces no germinaron en el medio de

cultivo, excepto *F. culmorum* que si germinó. A pesar de lo anterior, no hay correspondencia con los resultados del experimento ya que el género *Fusarium*, presentó muy pocos aislamientos, es decir que el tránsito a través del intestino dañó los propágulos fúngicos, debido a la gran actividad de enzimas como las trehalasas presentes en el intestino en una alta concentración y por lo tanto dejar a los conidios carentes de contenido citoplasmático. Esto probablemente explica la digestión del contenido celular de los hongos que contiene principalmente trehalosa (Siepel, 1996). También se reduce la viabilidad de los inóculos y por lo tanto, la cantidad de propágulos viables transportados por colémbolos en su intestino o cutícula probablemente es insuficiente para inducir o producir la enfermedad (Sabatini e Innocenti, 2001).

Sin embargo Brown (1995), menciona que la ingestión y exposición de las estructuras fúngicas a los fluidos intestinales pueden influir en gran medida la actividad bacteriana. Es decir, las comunidades bacterianas han demostrado ser más abundante y activas debido al paso por el intestino de los colémbolos, y según Fischer *et al* (1997) las bacterias inactivas se pueden activar durante este viaje intestinal debido a la eliminación de las endosporas y a la germinación de esporas bacterianas, pero esto no concuerda con los resultados del tratamiento 3, en donde solo en 5 aislamientos se encontraron bacterias, las cuales fueron representadas por unas cuantas colonias que se desarrollaron alrededor de donde se encontraba el colémbolo.

En el tratamiento **4 (Colémbolos vivos y squash)** se presentan los aislamientos obtenidos de la germinación de las estructuras presentes en el tracto digestivo de los colémbolos vivos y macerados, en los sitios de muestreo.

Cuadro 9. Total de aislamientos obtenidos del sito A

	AISLAMIENTOS	ESPECIE
	A1	<i>Fusarium oxysporum</i>
	A2	<i>Fusarium oxysporum</i>
	A2	<i>Alternario alternata</i>
	A3	<i>Fusarium verticilloides</i>
	A4	<i>Fusarium oxysporum</i>

SITIO "A" 18-JUL-13 Jatropha Curcas L.	A5	<i>Fusarium oxysporum</i>
	A6	<i>Fusarium oxysporum</i>
	C1	Micelio oscuro septado
	C2	Micelio oscuro septado
	C3	<i>Trichoderma</i> sp.
	E1	<i>Cladosporium</i> sp.
	E2	<i>Cladosporium</i> sp.
	E3	<i>Penicillium</i> sp.
	E4	<i>Penicillium</i> sp.
	E5	<i>Penicillium</i> sp.
		<i>Cladosporium</i> sp.
	E7	<i>Cladosporium</i> sp.
	E8	<i>Cladosporium</i> sp.
	F1	<i>Leptosphaerulina</i> sp.
	F2	<i>Leptosphaerulina</i> sp.
	F3	<i>Leptosphaerulina</i> sp.
	F4	<i>Leptosphaerulina</i> sp.
	F5	<i>Leptosphaerulina</i> sp.
	F6	<i>Leptosphaerulina</i> sp.
	F7	<i>Leptosphaerulina</i> sp.
	F8	Micelio claro Liso y bacterias
	F9	<i>Cladosporium</i> sp.
	F10	<i>Cephalosporium</i> sp.
	F11	<i>Cephalosporium</i> sp.
	F14	<i>Cephalosporium</i> sp.
	G1	<i>Cephalosporium</i> sp.
	G2	<i>Cephalosporium</i> sp.
	G3	<i>Cephalosporium</i> sp.
	G4	Micelio blanco Liso
	G5	Micelio blanco Liso
	H1	<i>Alternario alternata</i>
	H2	<i>Alternario alternata</i>
	H3	<i>Penicillium</i> sp.
	H4	<i>Penicillium</i> sp.
	H5	<i>Penicillium</i> sp.
	I1	<i>Fusarium</i> sp.
	I2	<i>Fusarium</i> sp.
	I3	<i>Fusarium</i> sp.

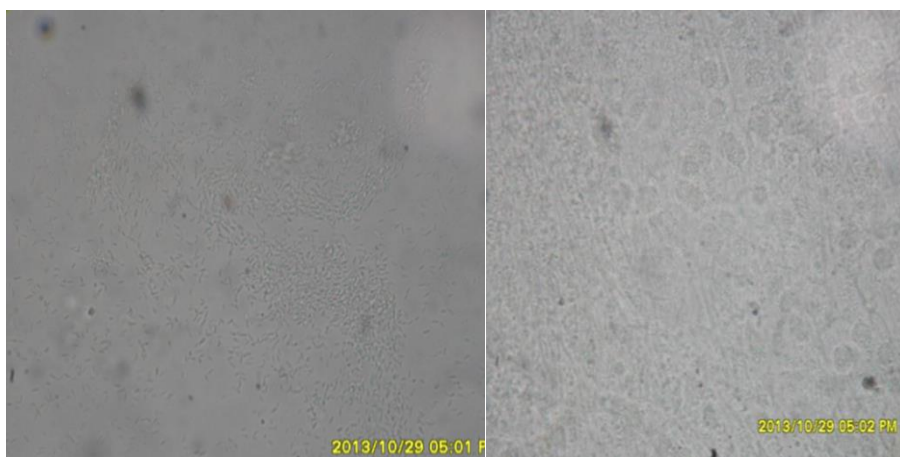


Figura 48. *Cephalosporium* sp.

Cuadro 10. Total de aislamientos obtenidos del sitio B

SITIO "B" 18-JUL-13 <i>Jatropha</i> <i>Curcas</i> L.	AISLAMIENTOS	ESPECIE
	A1	<i>Alternaria alternata</i>
	A2	<i>Fusarium</i> spp.
	C1	Micelio oscuro septado
	C2	<i>Fusarium oxysporum</i>
	C3	<i>Cladosporium</i> sp.
	D1	<i>Cladosporium</i> sp.
	E1	<i>Cladosporium</i> sp.
	E2	<i>Penicillium</i> sp.
	E3	Micelio liso claro y bacterias
	F1	<i>Fusarium fisuliforme</i>
	F2	<i>Pseudoplea briossione</i>
	F3	<i>Cladosporium</i> sp.
	G1	<i>Fusarium oxysporum</i>
	H1	<i>Alternaria alternata</i>
	H2	<i>Penicillium</i> sp.
	I1	<i>Aspergillus</i> sp.
	I2	<i>Fusarium oxysporum</i>
	J1	<i>Cladosporium</i> sp.

Los resultados indican que para esta prueba, germinaron especies fúngicas que no se habían presentado en los tratamientos anteriores como *Cephalosporium* sp., *Leptosphaerulina* sp., (*Pseudoplea briossione*), *Trichoderma* sp

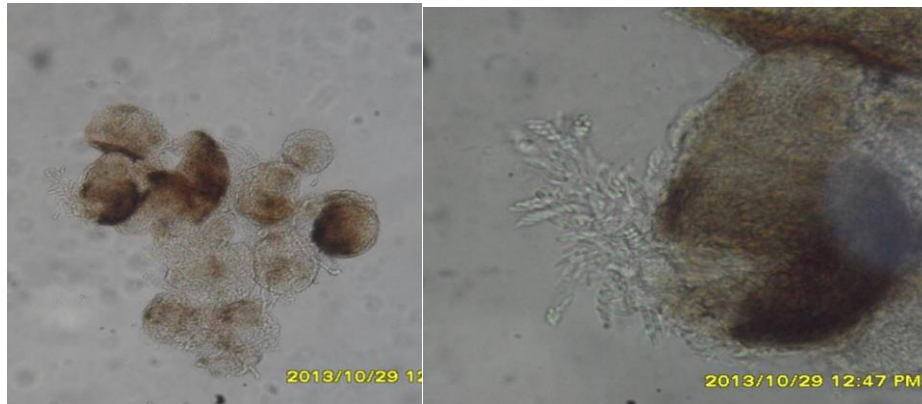


Figura 49. *Leptosphaerulina* (*Pseudoplea briosione*) (Jatropha)

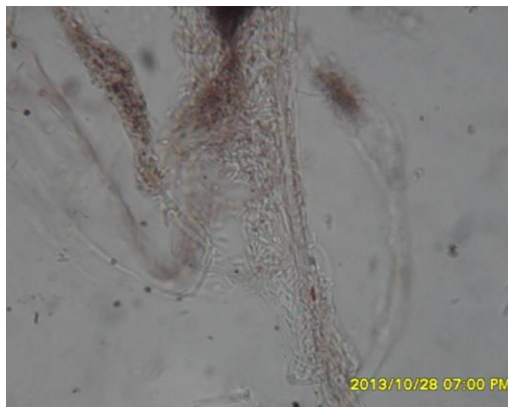


Figura 50. *Fusarium oxysporum*

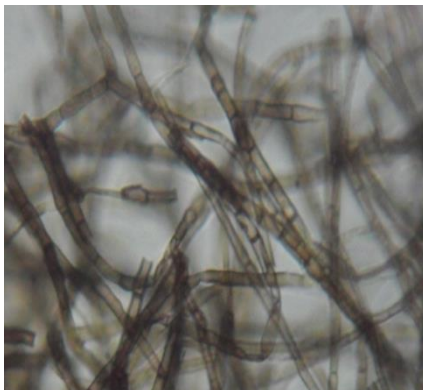


Figura 51. Micelio oscuro septado (Jatropha)

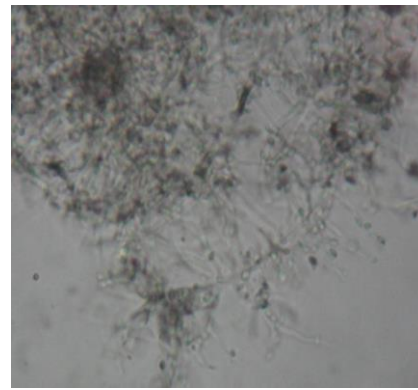


Figura 52. *Trichoderma* sp. (Jatropha)

Tratamiento 4 (Colémbolos vivos y squash)

Para el sitio A, las especies con mayor presencia fueron: *Cephalosporium* sp., *Leptosphaerulina* sp., *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., y aquellas que se presentaron en menor proporción *Alternaria alternata*, *Trichoderma* sp (Figura 53)

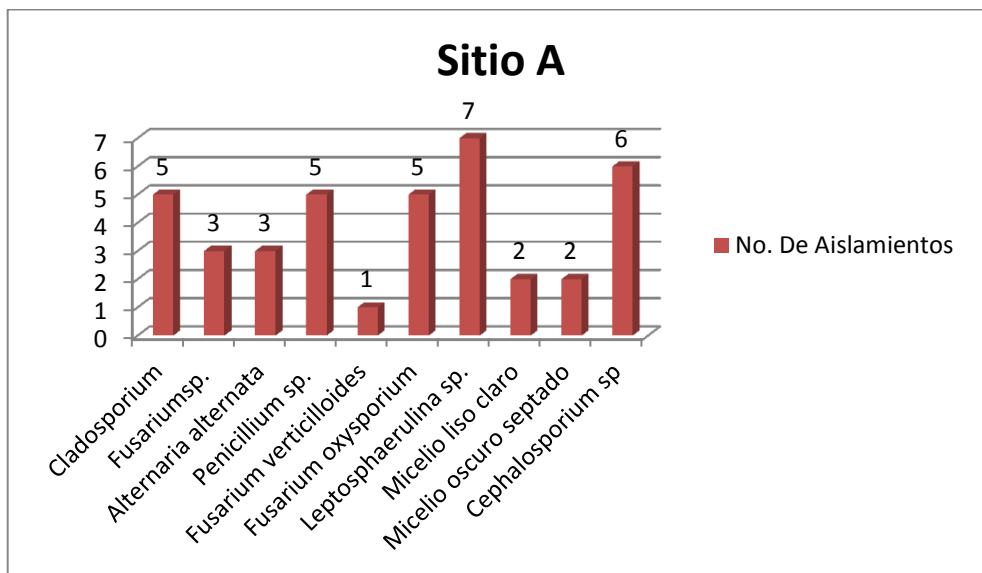


Figura 53. Total de aislamientos obtenidos del sitio A

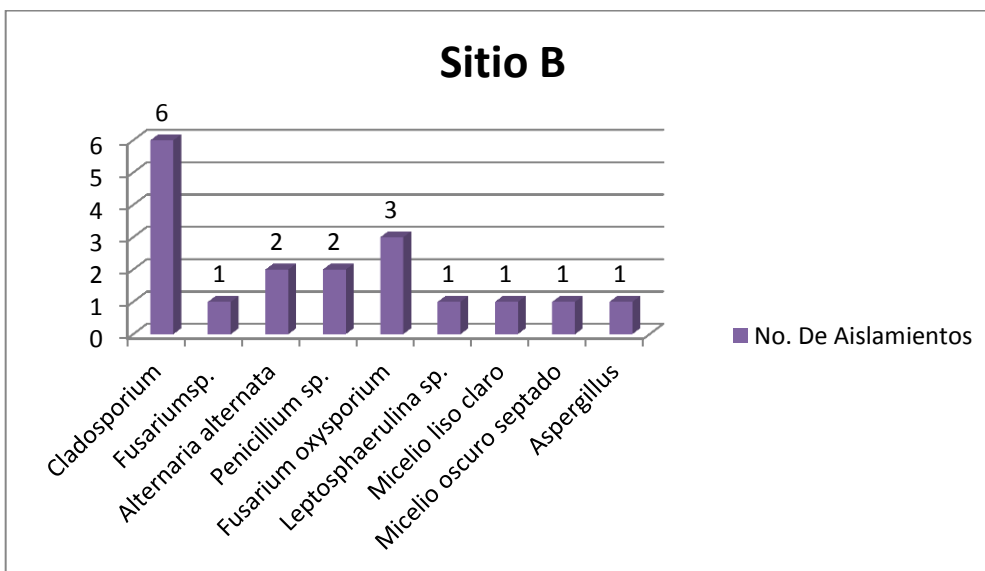


Figura 54. Total de aislamientos obtenidos del sitio B

Para el sitio B, las especies con mayor presencia fueron: *Cladosporium* sp., *Fusarium oxysporum* y en menor proporción *Pseudoplea briossione*, *Alternaria alternata* y *Penicillium* sp (Figura 54)

Los resultados indican que en ambos sitios de muestreo se encontró la especie *Cladosporium* sp. y que presentó una germinación alta. Además la especie *Leptosphaerulina* sp. (*Pseudoplea briossione*), aparece en ambos sitios, siendo el sitio A donde tuvo mayor germinación, así como *Cephalosporium* sp.

La germinación de otras especies fúngicas, se debió al hecho de que en el tratamiento 4 solo se introdujeron los colémbolos recién colectados sin desinfestar y se realizó un squash (triturado), lo cual indica que *O. bifasciata* presenta una amplia preferencia alimenticia, y según Christiansen (1964) la dieta de los colémbolos que habitan en la hojarasca es variable y consiste en su mayoría de esporas y micelios de hongos, levaduras, fragmentos de materia vegetal en descomposición y bacterias, sin embargo en aquellas especies que acostumbran subir a la vegetación (follaje) o que habitan permanentemente ahí, ingieren con más frecuencia granos de polen y esporas de hongos, esto se puede comprobar ya que en la visualización de los tractos digestivos no se encontraron esporas de hongos fragmentadas solamente, se encontraron también pedazos de material vegetal así como bacterias, las cuales llegaron a desarrollar colonias, en un solo aislamiento.

O. bifasciata no solo se alimenta de hongos saprófitos, sino que también llega a consumir hongos fitopatógenos (Bardgett *et al.*, 1993; Hopkin, 1997; Rusek, 1998), y según (Parkinson *et al.*, 1979 , Newell, 1984, Klironomos *et al.*, 1992) y en gran medida depende mucho de esas fuentes de alimento por presentar una gran cantidad de nutrientes como pueden ser nitrógeno y fósforo, vitales para su desarrollo y reproducción e inclusive por medio de su actividad de alimentación influyen en el comportamiento de los hongos que viven en el follaje.

Se observó los resultados y estos indicaron que hubo un mayor consumo de hongos fitopatógenos por parte de *O. bifasciata*, lo que concuerda con lo mencionado por Larsen *et al.*, 2004; Schrader y Lingnau, 1997, que los colémbolos al estar en el suelo su capacidad de búsqueda de alimento se ve limitada por las características estructurales del suelo, siendo una de estas los espacios porosos, con lo que se da mayor oportunidad a los saprófitos que a los fitopatógenos.

En el caso de los colémbolos de dosel, al no tener esas limitantes y debido a la alta humedad relativa (Rusek, 1998), éstos consumen más propágulos fúngicos como *Cladosporium* sp. *Cephalosporium* sp, por lo que son muy apetecibles para ellos (Wiggins y Curl 1979; Curl *et al.*, 1988; Innocenti *et al.*, 1997). Además se alimentan de hifas o estructuras metabólicamente activas de preferencia (Moore *et al.*, 1985), y también seleccionan las regiones del talo de los hongos con alto contenido de N (Leonard, 1984), lo cual hace que a los colémbolos les guste más los propágulos jóvenes y activos, a su vez la calidad de esos hongos pueden afectar las estrategias de vida de los colémbolos (Booth y Anderson 1979; Shaw 1988; Walsh y Bolger 1990 ; Chen *et al.*, 1995).

El consumo preferencial se cree que surge en primer lugar como una selección de alimento, al encontrar una fuente rica en nitrógeno, fósforo, y proteínas (Parkinson *et al.*, 1979), así mismo de localizar y seleccionar a los hongos *Cladosporium* sp. *Cephalosporium* sp., *Cephalosporium* sp., a partir de los compuestos volátiles que liberan y que son agradables para *O. bifasciata*, (Bengtsson *et al.*, 1988). Sin embargo existen algunas especies fúngicas que tienen metabolitos secundarios (toxinas) u olores que son repelentes para los colémbolos.

Cuando este tipo de hongos consumibles para los colémbolos no se encuentran en abundancia, los hexápodos pueden consumir otro tipo de especies fúngicas como los saprofitos, sin embargo eso va a depender de la disponibilidad de propágulos durante el año en el follaje. Matic and Koledin, (1985) y Lartey *et al.*,

(1989) mencionan que cuando se presenta una mezcla de hongos fitopatógenos y simbióticos, los colémbolos afectan solamente a los patógenos.

Podemos ver en el caso de *Fusarium* sp., que es un hongo aceptado en pruebas in vitro, Sabatini e Innocenti (1995) mencionan que es consumido favorablemente por *Protaphorura armata* y (Sabatini e Innocenti, 2001) que puede reducir significativamente el daño producido por éste patógeno en plántulas de trigo, pero en nuestros resultados hubo pocos aislamientos de *Fusarium* sp. en los dos sitios de muestreo, sin embargo Lootsma y Scholte, (1997) afirman que *Onychiurus pseudogranulosus* en pruebas de invernadero presento una supresión significativa *Fusarium oxysporum*, lo que concuerda con los resultados obtenidos en donde *F. oxysporum* fue preferido, ya que surgieron varios aislamientos en los dos sitio de muestreo, lo que significa que *O. bifasciata* se alimenta de este patógeno.

La germinación de todos los hongos del tracto digestivo se debe principalmente a que no todos los alimentos que son ingeridos por el colémbolo son degradados completamente, algunos componentes del bolo alimenticio (propágulos fúngicos) son tóxicos (Kilbertus *et al.*, 1981) y el paso de los hongos través del intestino puede dañar los propágulos debido a la gran concentración de sus enzimas (Urbasek y Rusek, 1994). Lo anterior reduce la viabilidad de los inóculos y por lo tanto disminuye la incidencia del hongo en la planta (Sabatini e Innocenti, 2001), ya que la cantidad de esporas viables después de su viaje por el intestino no son suficientes para producir una enfermedad, y de este modo modularían la competencia de hongos patógenos hacia la planta.

Es decir que el consumo de hongos saprofiticos favorece la estimulación y crecimiento de los hongos micorrizicos (Lussenhop y Bassiri, 2005), así como una mejor disposición de N y P hacia las plantas a través de los desechos fecales mediada (Gange, 2000).

Pruebas de preferencia alimenticia

El análisis estadístico de los resultados mostró la ausencia de triple interacción entre los días transcurridos desde la colecta de los colémbolos hasta la realización de los ensayos (DÍA). Las cepas utilizadas como alimento en las pruebas de alimentación (CEPA) y el tiempo de respuesta de los colémbolos (TIEMPO) (No se entiende que quiere explicar con esto).

Hubo dos dobles interacciones, la primera entre los días transcurridos desde la colecta de los colémbolos hasta la realización de los ensayos (Día) y las cepas utilizadas como alimento en las pruebas de alimentación (Cepa). La segunda entre los días transcurridos desde la colecta de los colémbolos hasta la realización de los ensayos (Día) y el tiempo de respuesta de los colémbolos (Tiempo) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Resultados del análisis factorial de las pruebas de alimentación de *Orchesella bifasciata* en condiciones de laboratorio.

Fuente de variación	Grados de libertad	F calculada	Valor de P
Día	3	26.15	<0.0001
Cepa	15	21.98	<0.0001
Tiempo	8	6.10	<0.0001
Día * Cepa	45	4.82	<0.0001
Día * Tiempo	24	2.82	<0.0001
Cepa * Tiempo	120	1.18	0.0982
Día * Cepa * Tiempo	360	1.12	0.0745

En cuanto a los factores principales, Día indica los días transcurridos desde la captura en campo hasta su utilización en las pruebas de preferencia alimenticia. Los colémbolos respondieron de manera diferencial, como se observa en el Cuadro 12. Tomando en cuenta que los colémbolos colectados en campo fueron tanto inmaduros como adultos y que de manera general un organismo recién emergido del huevo tarda seis días en convertirse en adulto, este último puede vivir hasta un año dependiendo de la especie (Jordana *et al.*, 1997). En el primer y segundo día de ensayo se encontró una mayor cantidad de inmaduros y el tercer día esta cantidad disminuyó, para que el sexto día toda la

población colectada estuvo compuesta de adultos, lo cual concuerda con lo reportado por Bilde *et al.*, (2000).

En los primeros días se observó que existía un mayor acercamiento de los colémbolos al alimento, al respecto Chapman y Boer (1995) describen que la necesidad de ingesta de nutrientes es mayor cuando los hexápodos mudan el exoesqueleto. En el caso de los colémbolos en estado juvenil, éstos mudan de 3 a 30 veces, según la especie; también en estado adulto pueden mudar, en menor número de veces que en estado juvenil (Jordana *et al.*, 1997).

En las hembras la ingesta de alimento es mayor respecto al macho (Calyecac *et al.*, 2004) e incrementa en los primeros días debido a la producción de huevos (Sabatini e Innocenti, 2000a). Tanto en machos como en hembras la ingesta de nutrientes decrece a mayor edad (Chapman y Boer, 1995) ya que se acercan al final de su ciclo de vida y como puede observarse en el Cuadro 12 fue el sexto día del ensayo cuando se tuvo el mayor porcentaje de mortalidad.

Cuadro 12. Porcentaje de especímenes de *Orchesella bifasciata* que respondieron a la atracción de colonias de los hongos fitopatógenos y porcentaje de mortalidad de los colémbolos a diferentes tiempos de la realización de las pruebas desde la colecta de los colémbolos.

Días transcurrido de la colecta al ensayo	Colémbolos sobre los hongos (%)	Colémbolos muertos durante el ensayo (%)
1	24.063 a	4.722 c
2	24.757 a	3.264 d
3	21.493 b	8.090 b
6	16.904 c	17.534 a

Los promedios se calcularon tomando en cuenta la respuesta y la mortalidad de todas las 16 cepas de hongos fitopatógenos y los nueve tiempos de observación.

Promedios con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Las pruebas de preferencia alimenticia mostraron que las esporas y las hifas de las 16 cepas de hongos fitopatógenos tuvieron diferencias significativas (Cuadro 13). Los hongos preferidos por *O. bifasciata* fueron en primer lugar *Cladosporium* sp., posteriormente la cepa 1 de *Aspergillus* sp. y en tercer lugar la cepa 2 de *Trichoderma* sp.

Para el primer y segundo hongo los porcentajes de mortalidad fueron bajas, sin embargo en el caso de la cepa 2 de *Trichoderma* sp., así como en la cepa 1 de éste hongo, el porcentaje de mortalidad fue el segundo mayor presentado en esta prueba. Esto último se pudo explicar debido a que la alimentación es el más básico comportamiento de sobrevivencia, tanto de manera individual como de la especie sin importar las necesidades de alimentación varían constantemente al cambiar el estado de nutrición, privación del alimento, estado de desarrollo y experiencia de alimentación (Chapman y Boer, 1995). También se debió en parte a que los colémbolos fueron sometidos a un periodo de ayuno, éstos ingirieron alimento para obtener nutrientes a pesar de las sustancias dañinas que pudieron estar presentes. Hiol *et al.* (1994) señalan que un factor de preferencia alimenticia es la morfología de los hongos.

Cuadro 13. Porcentaje de especímenes de *Orchesella bifasciata* que se encontraron sobre las colonias y porcentaje de mortalidad en las pruebas con diferentes cepas de hongos fitopatógenos.

Cepas de hongos fitopatógenos	Colémbolos sobre los hongos (%)	Colémbolos muertos durante el ensayo (%)
<i>Chaetomium</i> sp.	21.111 d	6.944 cd
<i>Phoma</i> sp.	23.472 d	3.889 ef
<i>Fusarium verticillioides</i>	16.389 e	8.056 cd
<i>Fusarium</i> sp.	16.806 e	10.139 c
Cepa 1 de <i>Fusarium oxysporum</i>	16.250 e	7.500 cd
Cepa 2 de <i>Fusarium oxysporum</i>	12.361 f	18.333 a
<i>Phomopsis</i> sp.	21.666 d	9.722 c
<i>Helminthosporium</i> sp.	21.111 d	3.056 f
Cepa 1 de <i>Alternaria alternata</i>	24.166 cd	4.444 ef
Cepa 2 de <i>Alternaria alternata</i>	28.056 ab	2.778 f
<i>Cladosporium</i> sp.	33.056 a	8.750 cd
Cepa 1 de <i>Trichoderma</i> sp.	14.028 ef	14.028 b
Cepa 2 de <i>Trichoderma</i> sp.	29.091 bc	14.028 b
Cepa 1 de <i>Aspergillus</i> sp.	31.944 ab	5.972 de
Cepa 2 de <i>Aspergillus</i> sp.	22.917 d	10.140 c
<i>Penicillium</i> sp.	16.528 e	6.667 de

Los promedios se calcularon tomando en cuenta la respuesta y la mortalidad en los cuatro días de la realización de las pruebas y los nueve periodos de observación.

Promedios con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

En las pruebas solo se ofreció un tipo de hongo a la vez, sin embargo en su hábitat natural los colémbolos pueden elegir y alimentarse del hongo más

conveniente para su desarrollo y reproducción (Bengtsson *et al.*, 1991). Los colémbolos son capaces de alterar sus estrategias de sobrevivencia en respuesta a la calidad de alimentos que representan los propágulos de los hongos que se desarrollan en su medio (Sabatini e Innocenti, 2000).

La cepa 2 de *Fusarium oxysporum* fue la menos consumida y se relacionó con la mortalidad más alta observada en este experimento. Al respecto Chapman y Boer (1995) mencionan que los animales deben ingerir necesariamente alimento para la producción de energía, para mantener los procesos bioquímicos, para crecer y desarrollarse; pero al mismo tiempo ellos deben rechazar el alimento que contienen compuestos tóxicos, los colémbolos usan los olores de los hongos candidatos a ser su alimento para poder evadir a los que producen sustancias dañinas (Headlurd *et al.*, 1995). Con base en lo anterior podemos señalar que el rechazo de *O. bifasciata* al único alimento ofrecido pudo deberse a la detección de metabolitos secundarios emitidos por la cepa 2 de *F. oxysporum*, pero que algunos organismos que pudieron alimentarse de él provocó la alta mortalidad registrada, al respecto Chapman y Boer (1995) indican que la composición química del alimento es uno de los más importantes factores que determinan la conveniencia del alimento y que el consumo del mismo es controlado principalmente por la detección de los estímulos químicos.

Los nutrientes estimulan la alimentación y los metabolitos secundarios actúan como inducción para la aceptación o el rechazo. Un ejemplo de rechazo es el reportado por Sabatini e Innocenti (2000a) para el hongo *Bipolaris sorokiriana* que produce metabolitos secundarios dañinos para el colémbolo *Mesaphorura krausbaueri*. Sin embargo existen diferencias entre especies en la detección de los metabolitos secundarios, lo que puede atribuirse a la diferencia en tamaño y a la diferencia en la distancia entre el abdomen y el sustrato que contiene los metabolitos secundarios (Schultz, 1991). Por ejemplo, a diferencia de lo obtenido en este trabajo, Sabatini e Innocenti (2000b) reportan a otra especie de *Fusarium* (*F. culmorum*) como el hongo más palatable para *Onychiurus*

armatus y *Folsomia candida*, en comparación con otros tres hongos fitopatógenos.

Al alimentarse de hongos fitopatógenos los colémbolos disminuyen el inóculo modulando la presencia de la enfermedad (Lenoir *et al.*, 2007). En el Cuadro 14 se puede observar que existieron diferencias significativas tanto en el porcentaje de individuos de *O. bifasciata* que se encontraron sobre los hongos como en la mortalidad de los mismos, en diferentes tiempo. Los resultados muestran que tiene que pasar un tiempo para que los colémbolos tomen el alimento, aunque también muestran que a mayor tiempo se tuvo la mayor mortalidad. Lo anterior puede explicarse debido a que una vez que los organismos tuvieron experiencias positivas en la alimentación (Chapman y Boer, 1995), ésta se incrementó y por lo tanto a las 48 horas de observación se tuvo el mayor porcentaje de colémbolos sobre los hongos, los cuales son una fuente de alimento para éstos organismos (Castaño-Meneses, 2004; Staaden *et al.*, 2010).

Cuadro 14. Porcentaje de especímenes de *Orchesella bifasciata* que se encontraron sobre las colonias de hongos fitopatógenos y porcentaje de mortalidad a diferentes tiempos.

Tiempo de respuesta de los colémbolos (h)	Colémbolos sobre los hongos (%)	Colémbolos muertos durante el ensayo (%)
30 minutos	17.098 d	0.7812 f
1	22.266 bc	1.641 f
2	22.734 ab	3.750 e
3	21.563 bc	5.547 de
6	19.453 dc	6.641 d
12	21.563 bc	9.766 c
24	23.047 ab	13.750 b
36	22.500 bc	14.609 b
48	25.547 a	19.141 a

Los promedios se calcularon tomando en cuenta la respuesta y la mortalidad en los cuatro días de la realización de las pruebas y en las 16 cepas de hongos fitopatógenos.

Promedios con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

La más alta mortalidad observada a las 48 horas, puede explicarse debido a la heterogeneidad de las edades de los colémbolos en la prueba y al ciclo de vida de éstos, ya que al colectarlos directamente de su medio no se discriminó entre

inmaduros y adultos. Aunque los adultos pueden vivir hasta un año, dependiendo de la especie (Jordana *et al.*, 1997), algunos de ellos pudieron haber llegado al final de su ciclo de vida, incrementando el porcentaje de mortalidad observado.

6. CONCLUSIONES

O. bifasciata, es un controlador biológico ya que se alimenta en su mayoría, de estructuras fúngicas (esporas, micelio) de hongos fitopatógenos, de *Jatropha curcas*.

O. bifasciata tiene preferencia hacia hongos fitopatógenos, ya que en el tracto digestivo, se encontraron estructuras de hongos que afectan a *J. curcas*, corroborado con aislamientos del tracto, además de que en pruebas in vitro también se alimentan de estos hongos.

Los hongos consumidos por *O. bifasciata*, por orden de preferencia, son: *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Alternaria alternata*., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Chaetomium* sp., *Helminthosporium* sp., *Fusarium* sp., *F. verticillioides* y *F. oxysporum*.

O. bifasciata, dispersa a los diferentes propágulos fúngicos, tanto en la cutícula, como en el tracto digestivo, estos germinan en medio de cultivo.

O. bifasciata, consumo mayor cantidad de propágulos de los hongos fitopatógenos, en los primeros instares de desarrollo. En estado adulto las hembras son las que consumen más alimento

6. LITERATURA CONSULTADA

- Achten, W. M. J., Nielsen, L. R., Aerts, R., Lengkeek, A. G., Kjaer, E. D., Trabucco, A., Hanse, J. K. Maes, W.H., Graudal, L., Akinnifesi, F. K. Muys, B. 2010. Towards domestication of *Jatropha curcas*. *Biofuels*, 1: 91-107.
- Achten, W. M. J., Verchot, L., Franken, Y. J., Mathijs, E., Singh, V. P., Aerts, R. & Muys, B. 2008. *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass & Bioenergy*, 32, 12, 1063-1084.
- Adebowale, K. O. & Adedire, C. O. 2006. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. *Afr. J. Biotechnol*, 5, 10, 901-906.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press, Burlington, M. A., AS.
- Alfonso, B. J. A. 2008. Manual para el cultivo de Piñón (*Jatropha curcas*) en Honduras. En línea: <http://www.gotaverde.org/userfiles/file/D17c%20Manual%20Cultivo%20Jatropha> Fecha de consulta. 13 de agosto de 2013.
- Andrade, S. F; Gabriel, D. 2008. Aspectos fitossanitários na cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de biodiesel. *Biológico*, São Paulo, 70(2), 63-64.
- Anonimo. 1992. Monografía, Xochitlán de Vicente Suárez. Primera Edición. Edición Visión Cultural, S. A. Impreso en México.
- Bardgett, R. D., Frankland, J. C., Whittaker, J. B., 1993. The effects of agricultural management on the soil biota of some upland grasslands. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 45, 25–45.

- Bauer, T. 1985. Beetles which use a setal trap to hunt springtails: the hunting strategy and apparatus of *Leistus* (Coleoptera, Carabidae). *Pedobiologia*. 28,275-287.
- Bautista, R. E. 2007. "Contribución al Estudio Etnobotánico del Piñón (*Jatropha curcas* L.) y Alternativas para la Conservación de su Plasma Germinal". Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo. 126 p.
- Bengtsson, G., Erlandsson, A., Rundgren, S., 1988 Fungal odour attracts soil Collembola, *Soil Biol. Biochem.* 20,25-30.
- Bengtsson, G., Hendlund, K. and Rundgren, S. 1991. Selective odor perception in the soil Collembola *Onychiurus armantus*. *Journal of Chemical Ecology* 17, 2113-2125.
- Bilde, T., J.A. Axelsen, and S. Toft. 2000. The value of Collembola from agricultural soils as food for a generalist predator. *J. Appl. Ecol.* 37: 672-683.
- Biocombustibles de Guatemala S. A. 2008. Creación de Vivero para la Producción de Plantas de *Jatropha curcas* a Nivel Regional. Informe Final. Guatemala, C. A.
- Bisse, J. 1988. Árboles de Cuba. Editorial Científico-Técnica. Ciudad de La Habana, Cuba. 154 p.
- Booth, R. G., Anderson, J. M. 1979 The influence of fungal food quality on the growth and fecundity of *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae). *Oecologia (Berl)*. 38, 317–323.
- Brown, G. G. 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant and soil.* 170,209-231.
- CAB International. 2012. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK. CAB International. En línea: <http://www.cabi.org/cpc/> Fecha de consulta: 07 de mayo de 2012.

- Calyecac, H. G. C. Cibrián, T. J., Bautista, N. M y López, J. C. 2004. Comportamiento de alimentación, cortejo, cópula y oviposición de *Trichobaris championi* Barber (Coleoptera: Curculionidae). *Agrociencia* 38: 365-373.
- Cassagnau, P. 1972 Un collembole adapte a la predation: *Cephalotoma grandiceps* (Reuter). *Nouvelle Rev. Entomol.* 2, 5-12.
- Castañón-Meneses, G., J. G. Palacios-Vargas, and L.Q. Cutz Pool. 2004. Feeding habits of collembola and their ecological niche. *Anales del Instituto de Biología Serie Zoología* 75: 135-142.
- Chapman, R. F. and Boer, G. 1995. *Regulatory Mechanisms in Insect Feeding*. Chapman & Hall. New York. 398 p.
- Chen, B., Snider, J. R. & Snider, M. J. 1997. Mouthparts of three collembolan species: Comparative morphology. *Invertebrate Biology*, 116: 355-362.
- Chen, B., Snider, R. J., Snider, R. M. 1995 Food preference and effects of food type on the life history of some soil Collembola. *Pedobiologia*, 39, 496–505.
- Christiansen, K. 1964. Bionomics of Collembola. *Ann. Rev. Entomol*, 9: 147-178.
- Coleman, D. C., Reid, C. P. P., Cole, C. V. 1983. Biological strategies of nutrient cycling in soil systems. *Advances in Ecological Research*. 13, 1–55.
- Cook, R. J., Baker, K. F., 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. APS Press, St.Paul, MN, USA.
- Curl, E. A. 1979. Effects of mycophagous Collembola on *Rhizoctonia solani* and cotton seedling disease. In *Soil-Borne Plant Pathogens* (B. Schippers and W. Gams, Eds.). Academic Press, London. 253-269 pp.
- Curl, E. A., Gudauskas, R. T., Harper, J. D., Peterson, C. M. 1985. Effects of soil insects on populations and germination of fungal propagules. In: Parker, C. A.

- Curl, E. A., Lartey, R. T., Peterson, C. M. 1988. Interactions between root pathogens and soil microarthropods. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 24, 249-261.
- El Titi, A., Ulber, B. 1991. Significance of biotic interactions between soil fauna and microflora in integrated arable farming. In: Beemster, A. B. R., Bollen, G. J., Gerlagh, M., Ruissen, M. A., Schippers, B., Tempel, A. (eds) *Biotic interactions and soil-borne diseases*. Elsevier, Amsterdam. 1–19. 41, 202–209 pp.
- Félix, M. J. G. 2008. Potencial de Producción de la *Jatropha curcas* en Sinaloa como una Alternativa más para la Generación de Biodiesel. Centro de Validación y Transferencia de Tecnología de Sinaloa A.C. (CVTTS) y Fundación Produce Sinaloa A. C.
- Fischer, K., Hahn, D., Honerlage, W., and Zeyer, J. 1997. Effect of passage through the gut of the earthworm *Lombricus terrestris* L. on *Bacillus megaterium* studied by whole cell hybridization. *Soil Biology and Biochemistry*, 29,1149-1152.
- Frati, F., Fanciulli, P. P and Dallai, R. 1992. Genetic diversity and taxonomy in soil-dwelling insects: the genus *Orchesella*. *J. Herdity*. 83,275-281.
- Fu, G. 2011. *Australasian Plant Disease Notes*. 2, 75.
- Gange, A. C. 2000. Arbuscular mycorrhizal fungi, Collembola and plant growth. *Trends in Ecology and Evolution*. 15, 369–372.
- Gomes, C., Medeiros, R. E., Romano, T., Marianowski, J., Pereira O. 2009. *Summa Phytopathology*. 35, 73
- Greenslade, P., J. A., & Grgurinovic, C. A. 2002. Collembola associated with fungal fruit-bodies in Australia. *Pedobiologia*, 46: 345-352
- Gutiérrez, A., Jaramillo M. y Mora, E. 2010. Elaboración de biocombustible a partir del *Jatropha curcas* piñón. Universidad de San Francisco de Quito.

- Hanlon, R. D. G; Anderson, J. M. 1979. Effects of collembola grazing on microbial activity in decomposing leaf litter . *Oecologia*, 38, 93-99.
- Harris, K. K., Boerner, R. E. J., 1990. Effects of belowground grazing by collembola on growth, mycorrhizal infection, and P uptake of *Geranium robertianum*. *Plant and Soil*. 129, 203–210.
- Hedlund, K., Bengtsson, G., Rundgren, S. 1995. Fungal odour discrimination in two sympatric species of fungivorous collembolans, unct. *Ecol.* 9 869-875.
- Hedlund, K., Bengtsson, G., Rungrend, S. 1995. Fungal odour discrimination in two sympatric species of fungivorous collembolans. *Functional Ecology* 9. 869-875.
- Hedlund, k., Boddy, L., and Preston, C. M. 1991. Mycelial responses of the soil fungus, *Mortierella isabellina*, to grazing by *Oxychirus armatus* (Collembola). *Soil Biology and Biochemistry*. 23,361-366.
- Heller, Joachim. 1996. *Physic nut. Jatropha curcas L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Henning, R. K. 2004. *The Jatropha System. Economy & Dissen Strategy*. International Conference Renewables.Bonn, Germany.
- Henning, R. K. 2007. "The Jatropha System" Integrated Rural Development by Utilisation of *Jatropha curcas L.* (JCL) as Raw Material and as Renewable Energy. Versión electrónica. www.jatrophabiodiesel.org. Fecha de consulta: 24 agosto de 2011
- Hiol, F. H., Dixon R. K. and Curl, E. A. 1994. The feeding preference of mycophagous Collembola varies with the ectomycorrhizal symbiont. *Mycorrhiza* 5: 99-103.

- Holldobler, B. and Wilson, E. O. 1990. *The Ants*. Berlin, Springer.
- Hopkin, S. P., 1997. *Biology of the Springtails*. Oxford University Press.
- <http://www.elocal.gob.mx/work/templates/enciclo/EMM21puebla/municipios/21202a.html> (10 de junio de 2013).
- Innocenti, G., Cappi, C., Sabatini, M. A. 1997 Interactions of Collembola with soil-borne cereal pathogen and biological control Fungi. In: Tvaruzek, L. (ed) *Proceedings of the International Conference Protection of cereal crops against harmful organisms*. Kromeriz. 72–75 pp.
- Johnson, D., Krsek, M., Wellington, E. M. H., Sctott, A. W., Cole, L., Bardgett, R. D., Read, D. J., Leake, J. R. 2005. Soil invertebrates disrupt carbon flow through fungal networks. *Science* 309, 1047.
- Jordana, R., J. I. Arbea, C. Simón y M. J. Luciñez. 1997. Collembola: Poduromorpha. En: *Fauna Ibérica*. Volúmen 8. Ramos, M. A. *et al.* (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales. Consejo Superior de Investigación Científica. Madrid. 807 p.
- Jorgensen, H. B., Elmholt, S., Petersen, H. 2003. Collembolan dietary specialisation on soil grown fungi. *Biology and Fertility of Soils*, 39, 9–15.
- Karg, W. 1971. Acari (Acarina) Milben, Unterordnung Anactinochaeta (Parasitiformes), Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. *Die Tierwelt Deutschlands*, Nr. 59, Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Kilbertus, G., Vannier, G. 1981. Relations microflore-microfaune dans la grotte de Sainte-Catherine (Pyrenees-orientales). I. Le régime alimentaire de *Tomocerus minor* (Lubbock) et *Tomocerus problematicus* Cassagnau (Insectes Collembolés), *Rev. Ecol. Biol. Sol* 18 3 19-338.
- Klironomos, J. N., Kendrick, B. 1996. Palatability of microfungi to soil arthropods in relation to the functioning of arbuscular mycorrhizae. *Biology and Fertility of Soils*, 21, 43–52.

- Klironomos, J. N., Widden, P., Deslandes, I. 1992 Feeding preferences of the collembolan *Folsomia candida* in relation to microfungal successions on decaying litter. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 685–692.
- Knight, C. B., Angel, R. A. 1967. A preliminary study of the dietary requirements of *Tomocerus* (Collembola), *Am. Midl. Nat.* 77 510-517.
- Kobilke, H. 1989. "Untersuchungen zur Bestandesbegründung von *Jatropha curcas* L." "Diploma thesis. University Hohenheim, Stuttgart.
- Kumar, A. & Sharma, S. 2008. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. *Ind. Crop. Prod.* 28, 1, 1-10.
- Larsen, T., Schjonning, P., Axelsen, J., 2004. The impact of soil compaction on euedaphic Collembola. *Applied Soil Ecology*, 26, 273–281.
- Lartey, R. T., Cur, E. A., Peterson, C. M. and Willims, J. C. 1991. Control of *Rhizoctonia solani* and cotton seedling disease by *Laetisaria arvalis* and a mycophagous insect *Proisotoma minuta* (Collembola). *Journal of Phytopathology*, 133, 89-98.
- Lartey, R. T., Curl, E. A., Peterson, C. M. and Harper, J. D. 1989. Mycophagous grazing and food preference of *Proisotoma minuta* (Collembola: Isotomidae) and *Onychiurus encarpatus* (Collembola: Onychiuridae). *Environmental Entomology*, 18, 334-337.
- Lenoir, L., T. Persson, J. Bengtsson, H. Wallander, and A. Wiren. 2007. Bottom-up or top-down control in forest soil microcosms? Effects of soil fauna on fungal biomass and C/N mineralization. *Biol. Fertil. Soils* 43: 2281-294.
- Leonard, M. A. 1984. Observations on the influence of culture conditions on the fungal preference of *Folsomia candida* (Collembola; Isotomidae). *Pedologia* 26, 361-367.

- Lezcano, J. C.; Martínez, B.; Alonso, O. 2010. Caracterización cultural y morfológica e identificación de 12 aislamientos fungosos de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. Pastos y Forrajes, 33(1), enero-marzo, 2010, 1-14p. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" Matanzas, Cuba.
- Lima, B. V., Soares, D. J., Pereira, O. L., Barreto, R. W. 2008. Australasian Plant Disease Notes 3,5.
- Lootsma, M. & Scholte, K. 1997. Effects of the springtail *Folsomia fimetaria* and the nematode *Aphelenchus avenae* on *Rhizoctonia solani* stem infection of potato at temperatures of 10 and 15 °C. *Plant Pathology*, 46: 203-208.
- Lozano, J. A. D. 2007. Jatropha. www.gvedinternational.org/file_117/jatropha/PDF. Consultado en Febrero 18, 2012.
- Lozoya, X. 2009. Una antigua medicina. In La Xuta se come A kin xuta tawuay; xuta, Jatropha, piñón o Ashtle patrimonio del Totonacapan. Universidad Veracruzana. 30-33 pp.
- Lussenhop, J., Bassiri Rad, H. 2005. Collembola effects on plant mass and nitrogen acquisition by ash seedlings (*Fraxinus pennsylvanica*). *Soil Biology & Biochemistry*, 37, 645–650.
- Makkar, H. P. S., Becker, K., Sporer, F. & Wink, M. 1997, Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J. Agr. Food Chem.* 45, 3152-3157.
- Martínez, H. J. 2006. El piñón (*Jatropha curcas*) una planta nativa de México con potencial alimentario y agroindustrial. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. IPN.
- Martinez, H. J. 2007. El Piñón mexicano: una alternativa bioenergética para México. IPN. Departamento del Centro de Desarrollo de Productos bióticos. Revista Digital Universitaria. Vol. 8 No. 12.

- Martínez, H. J., Siddhuraju, P., Francis, G., Dávila, O. G. and Becker, K. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels in four provenances of *Jatropha curcas* L. from México. *Food Chem.* 96: 80 - 89.
- Matic, R. and Koledin, D. 1985. Preference and feeding speciality of *Tetrodontophora bielanensis* (Collembola, Insecta) under laboratory conditions. *Rev. Ecol. Biol. Sol* 22,121-129.
- McMillan, J. H., Healey, I. N. A. 1971. quantitative technique for the analysis of gut content of Collembola, *Rev. Ecol. Biol. Sol* 8, 295-300.
- Melo, M. F. V., Santos, H. O., Silva-Mann, R., Mesquita, J. B. (2007). Fungos associados a sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/agricultura>>.
- Miller, K. I., Grady, L., Webster, L. L. 1962. Systematic position of *Cnidoscolus* and *Jatropha*. *Britonia*, 14:174-80.
- Mills, J. T. and Sinha, R. N. 1971. Interactions between a springtail, *Hypogastrura tullbergi*, and soil-borne fungi. *Journal of Economic Entomology*, 64, 398-401.
- Moody, S. A., Pearce, T. G., and Dighton, J. 1996. Effect of some fungal spores associated with wheat straw decomposition on passage through the guts of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea longa*. *Soil Biology and Biochemistry*, 28,533-537.
- Moore, J. C., Ingham, E. R., Coleman D.C. 1987. Inter and intraspecific feeding selectivity of *Folsomia candida* (Willem) (Collembola, Isotomidae) on fungi, *Biol. Fertil. Soils* 5 612.
- Moore, J. C., St. John, T. V., and Coleman, D. C. 1985. Ingestion of vesicular-arbuscular mycorrhizal hyphae and spores by soil microarthropods. *Ecology*. 66, 1979-1981.

- Munich y Kiefer. 1986. Distribución del Género *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) en el estado de Puebla.
- Nadtochiy, S. E. 1987. Fungi as constituents of gut contents in Sminthuridae and Dicyrtomidae (Collembola) In Soil Fauna and soil Fertility (B. R. Striganova, ed). Moscow: Nauka. 692-696 pp.
- Nakamura, Y., Matsuzaki, I., Itakura, J. 1992 Effect of grazing by *Sinella curviseta* (Collembola) on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* causing cucumber disease. *Pedobiologia*, 36, 168–171.
- Ndong, R. 2009. “Life Cycle Assessment of Biofuels from *Jatropha curcas* in West Africa: A Field Study” en *Global Change Biology Bioenergy*. Vol. 1, núm. 3, EUA. En: <http://oatao.univ-toulouse.fr/3617/1/Ndong_3617.pdf> (Accesado el 25 de enero del 2013).
- Newell, K. 1984. Interaction between two decomposer basidiomycetes and a collembolan under Sitka spruce: distribution, abundance and selective grazing. *Soil Biology and Biochemistry*. 16, 227–233.
- Nolasco, G. V. 2013. Patogenos asociados al follaje y semillas de *Jatropha curcas* L. en el estado de Puebla. Tesis de Maestria en Ciencias. Departamento de Parasitología Agrícola. UACH. México.
- OCTAGON S. A. 2006. Biocombustibles. *Jatropha curcas* su expansión agrícola para la producción de aceites vegetales con fines de comercialización energética. Guatemala. 42 p.
- OFI-CATIE, 2007. Descripciones de especies: *Jatropha curcas* L. Árboles de Centroamérica. 621-624 p.
- Palacios V. F. G. 1988. Claves para la identificación de algunos géneros de Colémbolos más comunes en México. Facultad de Ciencias. UNAM 10 p.

- Parkinson, D., Visser, S., and Whittaker, J. B. 1979. Effects of collembolan grazing on fungal colonization of leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry*. 11, 529-535.
- Pérez, R. 2012. *Jatropha curcas*, el motor del bosque. Nuestros árboles. Segunda Etapa. Núm. 78. *Revista México Forestal*. En línea: http://www.mexicoforestal.gob.mx/hemeroteca/etapa-2/numero78#nuestros_arboles Fecha de consulta: 08 de mayo de 2012.
- Prakash, A. R.; Patolia, J.S.; Chikara, J. & Boricha, G. N. 2007. Floral biology and flowering behaviour of *Jatropha curcas*. In: Expert seminar on *Jatropha curcas* L. agronomy and genetics, march 26–28. Wageningen, The Netherlands: Published by FACT Foundation.
- Prihandana, R. and R. Hendroko. 2006. *Petunjuk Budi Daya Jarak Pagar*. Agromedia Pustaka, Jakarta
- Quiroga, M. R. R; Aguilar, E. A; Morales, C. J. M; Rosales, M. A. E. y Gil, G. M. 2010. Guía ilustrada de insectos y arañas asociadas al piñón (*Jatropha curcas* L.) en Chiapas, México, con énfasis en la depresión central. Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de ciencias agronómicas. 132 p.
- Republic of Indonesia Department of Agriculture. 2006. Peluncuran Perdana Benih Unggul Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.). Info Tek Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Vol. 1 No. 7, 2006 in www.deptan.go.id/berita/update27juli06/infotek/JP/No.207/2006.pdf Accessed on January 17, 2006.
- Rodríguez, H. R., Salinas, C. E., Zamarripa, C. A., H. Espinosa-Paz. 2012. PIÑÓN MEXICANO E HIGUERILLA: Rentabilidad y competitividad de su cultivo para biodiesel en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca. Santo Domingo Barrio Bajo, Etla, Oaxaca, México. Libro Técnico No. 18, 207 p.

- Rooney, N., McCann, K., Gellner, G., Moore, J. C., 2006. Structural asymmetry and the stability of diverse food webs. *Nature*, 442, 265–269.
- Rusek, J. 1985 Ecology of collembola . In *3rd international seminar on Apterygota* (R. Dallai ed.), Siena: Univ. Siena Press. 271-281 pp.
- Rusek, J. 1989. Ecology of Collembola. In *3rd International Seminar on Apterygota* (R. Dallai ed.). Siena: Univ. Siena Press. 271-281 pp.
- Rusek, J. 1998. Biodiversity of Collembola and their functional role in the ecosystem. *Biodiversity and Conservation*. 7, 1207–1219.
- Sabatini, M. A. & Innocenti, G. 1995 Interactions between Collembola and soil-borne cereal fungi. *Polskie Pismo Entomologiczne*. 64: 191±197.
- Sabatini, M. A. and Innocenti, G. 2000b. Soil-borne plant pathogenic fungi in relation to some collembolan species under laboratory conditions. *Mycology Research* 104: 1197-1201.
- Sabatini, M. A., Innocenti, G. 2000a. Functional relationships between Collembola and plant pathogenic fungi of agricultural soil. *Pedobiologia*. 44, 467-475
- Sabatini, M. A., Innocenti, G. 2001. Effects of Collembola on plant-pathogenic fungus interactions in simple experimental systems. *Biol. Fertil. Soils*. 33, 62–66.
- Sánchez, H. D. E. 2008. Obtención, análisis y germinación de semillas de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae Juss.) no tóxica de Veracruz, México. Tesis. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. En línea: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/28698/1/SanchezHerrera.pdf>
Fecha de consulta: 08 de mayo de 2012.
- Saur, E., Ponge, J. F. 1988. Alimentary studies on the Collembolan *Paratullbergia callipygos* using transmission electron microscopy, *Pedobiologia*. 3, 1 355-379.

- Schmook, B., Serralta, P. L. & Ku, V. J. 1997. *Jatropha curcas*: distribution and uses in the Yucatan Peninsula. Proceedings of First International Symposium on Biofuel and Industrial Products from *Jatropha curcas* and other Tropical Oil Seed Plants. Managua, Nicaragua. 15 p.
- Schrader, S., Lingnau, M. 1997. Influence of soil tillage and soil compaction on microarthropods in agricultural land. *Pedobiologia*.
- Sharma, N. & Trivedi, P. C. 2002. Screening of leaf extracts of some plants for their nematocidal and fungicidal properties against *meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum*. *Asian J. Exp. Sci*, 16 (1-2), 21.
- Sharma, N. and Serraf, A. 2007. Plantation Management: Activities labour costs. Expert seminar on *jatropha curcas* L. Agronomy and genetics. Wageningen The netherlands. Published By FACT Foundation.
- Shaw, P. J. A. 1988. A consistent hierarchy in the fungal feeding preferences of the Collembola *Onychiurus armatus*. *Pedobiologia*, 31, 179–187.
- Siepel, H. 1996. Biodiversity of soil microarthropods: the filtering of species. *Biodiversity and Conservation*, 5, 251-260.
- Staadén, S., Milcu, A., Rohlf, M., Scheu, S., 2010. Fungal toxins affect the fitness and stable isotope fractionation of Collembola. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 1766-1773.
- Sutton, B.C. 1980. The Coleomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Torres, R. 2011. New Disease Reports, 23, 6
- Urbšek, F. and Rusek, J. 1994. Activity of digestive enzymes in seven species of Collembola (Insecta: Entognatha). *Pedobiologia*, 38, 400-406.
- Vegter, J. J. 1983. Food and habitat specialization in coexisting springtails (Collembola, Entomobryidae). *Pedobiologia*, 25: 253-262.

- Visser, S., Whittaker J. B., 1977 Feeding preferences for certain litter fungi by *Onychiurus subtenuis* (Collembola), *Oikos* 29, 32.
- Walsh, M. I., Bolger, T. 1990. Effects of diet on the growth and reproduction of some Collembola in laboratory cultures. *Pedobiologia*, 34, 161–171.
- Warnock, A. J., Fitter, A. H., and Usher, M. B. 1982. The influence of a springtail *Folsomia candida* (Insecta, collembola) of the mycorrhizal association of leek *Allium porrum* and vesicular –arbuscular mycorrhizal endophyte *Glomus fasciculatum*. *New Phytologist*, 90,285-292.
- Wiggins, E. A., Curl, E. A. 1979. Interaction of Collembola and microflora of cotton rhizosphere. *Phytopathology*, 69, 244–249.
- Wilbur, R. L. 1954. A synopsis of *Jatropha*, subsection *Eucurcas*, with the description of two new species from Mexico. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 70:92-101.
- Wolter, H. 1963. Vergleichende Untersuchungen zur Anatomie und Funktionsmorphologie der stechend-saugenden Mundwerkzeuge der Collembolen. *Zool. Jb., Anat.* 81, 27-100.
- Xing, K. 2011. *Int J Syst Evol Microbiol*, in press.
- Zamarripa, A. y Díaz, G. 2008. Áreas de potencial productivo de piñón *Jatropha curcas* como especie de interés bioenergético en México. Sistema Nacional de Sistema Producto-Oleaginosas. En: <www.oleaginosas.org/art_211.shtml> (Accesado el 25 de enero del 2013).
- Zamarripa, C. A., Pecina, Q. V., Avendaño, A. C. H., Solís B. J. L. & Martínez, V. B. B. 2010. Genetic diversity of mexican collection of germplasm *Jatropha curcas* L. 18th European Biomass Conference and Exhibition. Lyon France.

Zamarripa, C. A., Ruíz, C. P. A., Solís, B. J. L., Martínez, H. J., Olivera, S. A., Martínez, V. B. B. 2009. Biocombustibles: perspectivas de producción de biodiesel a partir de *Jatropha curcas* L. en el trópico de México. Folleto Técnico No.12 INIFAP. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México. 46 p.