

Hongos nematófagos del género *Arthrobotrys* spp., en el control de *Meloidogyne incognita* bajo condiciones *in vitro*

Nematophagus fungi *Arthrobotrys* spp., against *Meloidogyne incognita* under *in vitro* conditions

Diego Alejandro Treviño-Cueto¹, Melchor Cepeda-Siller^{*2},
Francisco Daniel Hernández-Castillo², Sergio René Sánchez-Peña²

¹Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. CP 25315. e-mail: melchoresraza2010@hotmail.com [*Autor responsable].

RESUMEN

El nematodo agallador *Meloidogyne incognita* está reportado como el principal nematodo que causa daños severos en la agricultura alrededor del mundo. Los hongos nematófagos del género *Arthrobotrys* spp. son enemigos naturales de los nematodos, a los que pueden inmovilizar y digerir. Con la finalidad de disminuir el uso de nematocidas químicos, se pretende generar nuevas tecnologías a partir del uso de agentes para el control biológico de *Meloidogyne incognita*, como los hongos nematófagos del género *Arthrobotrys* spp. El objetivo del presente trabajo fue identificar especies del hongo del género *Arthrobotrys*, de diferentes regiones agrícolas de México, que tenga actividad nematófaga contra *Meloidogyne incognita*. Para obtener hongos y nematodos, durante 2014 se realizó la presente investigación a partir del uso de metodologías propias. Se procesaron 150 muestras de suelos agrícolas de una profundidad de 0 a 15 cm. Mediante técnicas de microscopía y claves taxonómicas se identificaron y encontraron cinco diferentes cepas de hongos nematófagos: *Arthrobotrys musiformis* (HN01), *Drechslerella yunnanensis* (HN02), *Arthrobotrys oligospora* (HN03), *Arthrobotrys* spp. (HN04), *Arthrobotrys musiformis* (HN05). Se realizaron bioensayos de actividad nematófaga, bajo condiciones *in vitro*, de cada especie identificada del género *Arthrobotrys* contra *Meloidogyne incognita*. En una caja Petri de 5 cm de diámetro se depositaron hongos juveniles del segundo estadio de *Meloidogyne incognita*, a los que se les agregaron concentrados celulares 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 durante un periodo de 168 h. Se estableció un diseño completamente al azar, con arreglo factorial de 15 tratamientos con cinco repeticiones más un testigo adicional. Los datos obtenidos se estudiaron mediante un análisis probit, de los que se evaluó el porcentaje mortalidad con un análisis de varianza entre media de tratamientos y TL_{50} . La capacidad nematófaga de cada hongo fue: HN01 94% TL_{50} 106.07h; HN02 59% TL_{50} 146.53h; HN03 87% TL_{50} 118.24h; HN04 69% TL_{50} 136.98h; HN05 72% TL_{50} 131.88 h.

ABSTRACT

The root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, is reported as the main nematode that causes severe damage to agriculture around the world. Nematophagous fungi such as *Arthrobotrys* spp are natural enemies of nematodes, which can immobilize and digest. In order to reduce the use of chemical nematocides, it aims to generate new technologies for biological control of *Meloidogyne incognita*, from the use of control agents such as fungi of the genus *Arthrobotrys* spp. The aim of this study was to identify species of the fungus genus *Arthrobotrys* with nematophagous activity against *Meloidogyne incognita*, in different agricultural regions of Mexico. This research was conducted during 2014. 150 samples of agricultural soils from a depth of 0-15 cm based on its own to obtain fungi and nematodes were processed methodologies. The fungi were identified using microscopy techniques and taxonomic keys, finding five different strains of nematophagous fungi, *Arthrobotrys musiformis* (HN01), *Drechslerella yunnanensis* (HN02), *Arthrobotrys oligospora* (HN03), *Arthrobotrys* spp., (HN04), *Arthrobotrys musiformis*. (HN05). Nematophagous bioassays activity of each identified species of the genus *Arthrobotrys* against *Meloidogyne incognita* under *in vitro* conditions were performed. These were conducted in Petri dish 5 cm diameter, containing second stage juveniles of *Meloidogyne incognita*, adding concentrated cell 1×10^5 , 1×10^6 and 1×10^7 for a period of 168h. A completely random design was established factorial arrangement with 15 treatments with 5 more reps an additional witness, the data obtained were analyzed by R. The percent mortality was evaluated by performing an analysis of variance between treatments and TL_{50} average by probit analysis. The nematophagous capacity was 94% HN01 TL_{50} 106.07h; 146.53h TL_{50} 59% HN02; 118.24h TL_{50} 87% HN03; 136.98h TL_{50} 69% HN04; 131.88h TL_{50} 72% HN05.

Palabras clave: nematodos fitopatógenos, control biológico, Orbileaceae

Key words: plant parasitic nematodes, biologic control, Orbileaceae

INTRODUCCIÓN

Los nematodos conforman uno de los grupos de animales más diversos en el planeta. Se han descrito alrededor de 28,000 especies, de las cuales 16,000 son parásitas (Hugot *et al.*, 2001). Los nematodos fitopatógenos, que son el mayor grupo, se alimentan y reproducen en plantas y tienen la capacidad de migrar desde la rizósfera hasta la parte aérea; pueden ocasionar daños que van desde lesiones insignificantes hasta la destrucción total de las plantas. Los nematodos fitopatógenos representan uno de los mayores estreses bióticos en el mundo, ya que causan pérdidas económicas a los cultivos de más de 100 billones de dólares anualmente (Chitwood, 2003). La mayoría de las pérdidas de cosecha que ocasionan los nematodos fitopatógenos las infligen solamente especies pertenecientes a dos grupos de nematodos: noduladores *Meloidogyne* spp. y quísticos *Heterodera* y *Globodera* spp. (Molinari, 2011). El alto impacto de estos nematodos sobre la agricultura en el mundo, es el resultado de su amplia distribución y habilidad de atacar a todo tipo de planta cultivada (Sasser, 1980). Para su control, se han reportado diversos métodos: el uso de cultivos de cobertura, abonos, enmiendas del suelo, cultivares resistentes, tratamiento de agua caliente, rotación de cultivos y tratamiento de barbecho (Barker y Koenning, 1998).

Los nematicidas químicos se han utilizado ampliamente para controlar los nematodos fitopatógenos, pero estos compuestos están a menudo asociados con efectos ambientales perjudiciales, lo que ha provocado se reduzca sustancialmente su uso en los últimos años. Por ejemplo, bromuro de metilo, uno de los fumigantes químicos más importantes que se utilizan para controlar los nematodos y otras plagas, afecta a una amplia gama de organismos, incluidos los benéficos, además de contribuir al agotamiento de la capa de ozono de la Tierra (Carpenter *et al.*, 2001).

En las últimas décadas, la preocupación por los riesgos ambientales que provoca el uso de nematicidas químicos, han llevado al desarrollo de agentes de control biológico como un componente de protección de los cultivos. El control biológico está definido como la supresión de la densidad de una población o el impacto de un organismo plaga específico mediante el uso de organismos vivos (Eilenberg *et al.*, 2001). Los agentes de control biológicos pueden regular las poblaciones de nematodos fitopatógenos; se han reportado numerosos organismos que tienen actividad antagónica contra nematodos fitopatóge-

nos entre los que se incluyen: hongos, bacterias, virus y algunos invertebrados (Tian *et al.*, 2007).

En los últimos años se ha puesto mayor interés en el uso de los hongos nematófagos, los cuales tienen la capacidad de capturar, parasitar o paralizar nematodos durante todo su ciclo de vida. Estos hongos juegan un rol importante como antagonistas de nematodos, lo que ha provocado que exista un gran interés en su uso como agentes de control biológico (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006). Se han descrito más de 700 especies de hongos nematófagos (Zhang *et al.*, 2011), que de acuerdo con su modo de infección, se clasifican en cuatro grupos: 1) hongos atrapadores, los cuales capturan a nematodos de vida libre mediante estructuras especializadas, 2) hongos endoparásitos, que infectan a los nematodos al utilizar sus esporas adhesivas, 3) hongos productores de toxinas, las cuales secretan para inmovilizar a los nematodos, y 4) hongos parásitos de huevos y quistes, que infectan estos estadios mediante puntas hifales (Li *et al.*, 2000).

Los hongos nematófagos aparecen en la mayoría de las taxas: Ascomycetos, Basidiomicetos, Zygomycetos, Chytridiomicetos y Oomycetos (Gams y Zare, 2003). El presente trabajo se enfocó al género de hongo nematófago *Arthrobotrys* spp., que está clasificado como un hongo atrapador de nematodos. Su actividad depredadora fue descubierta por Zopf (1888), al detectar que es capaz de crear redes o trampas que atraen a los nematodos para inmovilizarlos.

El objetivo de esta investigación fue aislar, identificar cepas de hongos nematófagos del género *Arthrobotrys* spp. en suelos agrícolas, así como probar su efectividad biológica contra el nematodo agallador *Meloidogyne incognita*, bajo condiciones *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó dentro del laboratorio de nematología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Selección de muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron proporcionadas por el laboratorio de nematología de la empresa Green Corp Biorganiks de México S.A. de C.V., el cual tiene una entrada de muestras para ser analizadas para diagnóstico nematológico. Se seleccionaron 150 muestras de una profundidad de 0-15 cm, con base en los siguientes criterios: región geográfica, tipo de suelo y cultivo establecido.

Aislamiento e identificación de cepas de hongos nematófagos

Cada muestra seleccionada se procesó independientemente. Los aislamientos de los hongos nematófagos se llevaron a cabo de acuerdo con la técnica de espolvoreado en placa, descrita por Ghahfarokhi, 2004, a los que se les agregó 1 gr de suelo, previamente homogenizado directamente en las placas Petri con agar agua. Después de tres días de incubación a 25° C, se colocaron de 500-1000 J₂ del nematodo *Meloidogyne incognita*. Las placas Petri se monitorearon cada 24 h para observar estructuras típicas de los hongos bajo microscopio estereoscópico. Los hongos que presentaron estructuras características se transfirieron a placas Petri con PDA (Agar Papa Dextrosa) mediante la técnica de punta de hifa (Gams, 1998) con el fin de obtener cultivos puros. La identificación de hongos nematófagos se basó en la observación morfológica bajo microscopía utilizando como referencia las claves de identificación taxonómica de Zhang, 2014 y las estructuras como trampas y anillos, medidas de conidióforo y conidios características del orden Orbilia.

Estudios de efectividad biológica contra *Meloidogyne incognita*

Para este estudio, se incrementaron las cepas aisladas con el método de medio de cultivo sólido en placas Petri con PDA, y se incubaron a 25° C durante un periodo de 96 h; posteriormente se llevó a cabo un barrido de esporas con la ayuda de una varilla de vidrio y una suspensión de agua+tween 20 al 0.1%, hasta obte-

ner una suspensión conidial, a la que se le realizó un conteo de conidios bajo microscopio con una cámara de Neubauer, para así tomar la concentración máxima, media y baja, que se utilizó en el bioensayo de efectividad biológica: los de actividad nematófaga de cada especie identificada del Género *Arthrobotrys* spp., contra los de *Meloidogyne incognita* bajo condiciones *in vitro*. Estos se llevaron a cabo en caja Petri de diámetro de 5 cm que contenía +/- 100 juveniles del segundo estadio de *Meloidogyne incognita*, a los que se les agregaron concentrados celulares 1x10⁵, 1x10⁶ y 1x10⁷ U.F.C/ml (Unidades Formadoras de Colonias), durante un periodo de 168 h. Se estableció un diseño completamente al azar, con arreglo factorial de 15 tratamientos con cinco repeticiones más un testigo adicional. Los datos que se obtuvieron se analizaron mediante el Software estadístico R versión 3.2. Se evaluó el porcentaje mortalidad con un análisis de varianza entre media de tratamiento, con un nivel de confianza del 95% y tiempo letal medio (TL₅₀), mediante un análisis de regresión probit.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cepas identificadas

De un total de 150 muestras analizadas se lograron aislar e identificar, de acuerdo con las claves taxonómicas de Zhang, 2014, cinco cepas de hongos nematófagos, de las cuales destacaron los géneros *Arthrobotrys* spp. y *Drechlerella* spp. Las características morfológicas y morfométricas se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Especies de hongos nematófagos identificados.

Clave designada	Género hongo	Especie	Tipo de trampa	Rango de medida de conidióforo	Rango de medida de conidio	Origen	Hospedero
HN01	<i>Arthrobotrys</i>	<i>musiformis</i>	Red	104-640 µm	20-47.5 µm x 7-12.5µm	Chiapas	Banano
HN02	<i>Drechlerella</i>	<i>yunnanensis</i>	Anillo	60-100µm	7.8-12.9 × 3.3-4.2 µm,	Guanajuato	Chile
HN03	<i>Arthrobotrys</i>	<i>oligospora</i>	Red	110-440 µm	17-35 × 8.5-16µm.	Michoacán	Zarzamora
HN04	<i>Arthrobotrys</i>	<i>spp.</i>	Red			Coahuila	Pino
HN05	<i>Arthrobotrys</i>	<i>musiformis</i>	Red	104-640 µm	20-47.5 µm x 7-12.5µm	Chiapas	Banano

Mitsui (1985) menciona que la mayoría de los hongos nematófagos se encuentran en la primera capa del suelo de 10-30 cm, lo cual coincide con la profundidad de las muestras utilizadas para el aislamiento de las cepas de hongos. Persmark y Jansson (1997) investigaron la rizósfera de cultivos de cebada, habas y mostaza, y encontraron más densidad de hongos en muestras donde estaban los cultivos establecidos. Además encontraron que las especies más comunes de hongos nematófagos fueron *Arthrobotrys oligospora*. Sin embargo, *Arthrobotrys musiformis*, *A. robusta* y *Dactylella lobata* también son significativamente más abundantes que otras especies (Jaffee y Strong, 2005).

Bioensayos de efectividad biológica laboratorio

Todas las cepas aisladas de hongos nematófagos tuvieron un efecto nematicida contra los J₂ de *Meloidogyne incognita*. Los tratamientos que mostraron mayor porcentaje de mortalidad fueron los de mayor concentración (1×10^7 U.F.C./ml); además se observó que la mortalidad máxima se alcanzó en el tiempo máximo de evaluación de 196 h. En el Cuadro 2 se presentan los tratamientos de mayor relevancia. Los tratamientos que demostraron los mayores porcen-

tajes de mortalidad fueron: la cepa HN01 (*Arthrobotrys musiformis*), con 96% A y un TL medio de 106.07 h; la HN03 (*Arthrobotrys oligospora*), con un porcentaje de 87% de mortalidad y un TL₅₀ de 118.24 h; la HN05 (*Arthrobotrys musiformis*) con 72% y un TL₅₀ de 131.88; la HN04 (*Arthrobotrys* spp.) y, finalmente, la HNO₂ (*Drechslerella yunnanensis*) con 59% y un TL₅₀ de 146.56. En la Figura 1 se presenta la gráfica del comportamiento de las cepas a través del tiempo.

Se encontró una variabilidad entre el control que ejercieron las cepas entre los diferentes aislados. Esta variabilidad puede deberse a las diferentes características de adaptabilidad de cada una a las diferentes variables: los factores edáficos, la temperatura y la región geográfica de la cual se aislaron las cepas. Los porcentajes de mortalidad concuerdan con los reportados por Gutiérrez (2013), los cuales muestran que se redujo la población del nematodo *Haemonchus contortus* con cepas de *A. musiformis* en 97% y *A. oligospora* en 90.3%. Park (2002) probó la efectividad de 19 cepas del género *Arthrobotrys* spp. contra *Caenorhabditis elegans*, ya que en todos los casos se redujo su población por arriba de 90%. Dávila (2005) demostró que los tratamientos de mayor concentra-

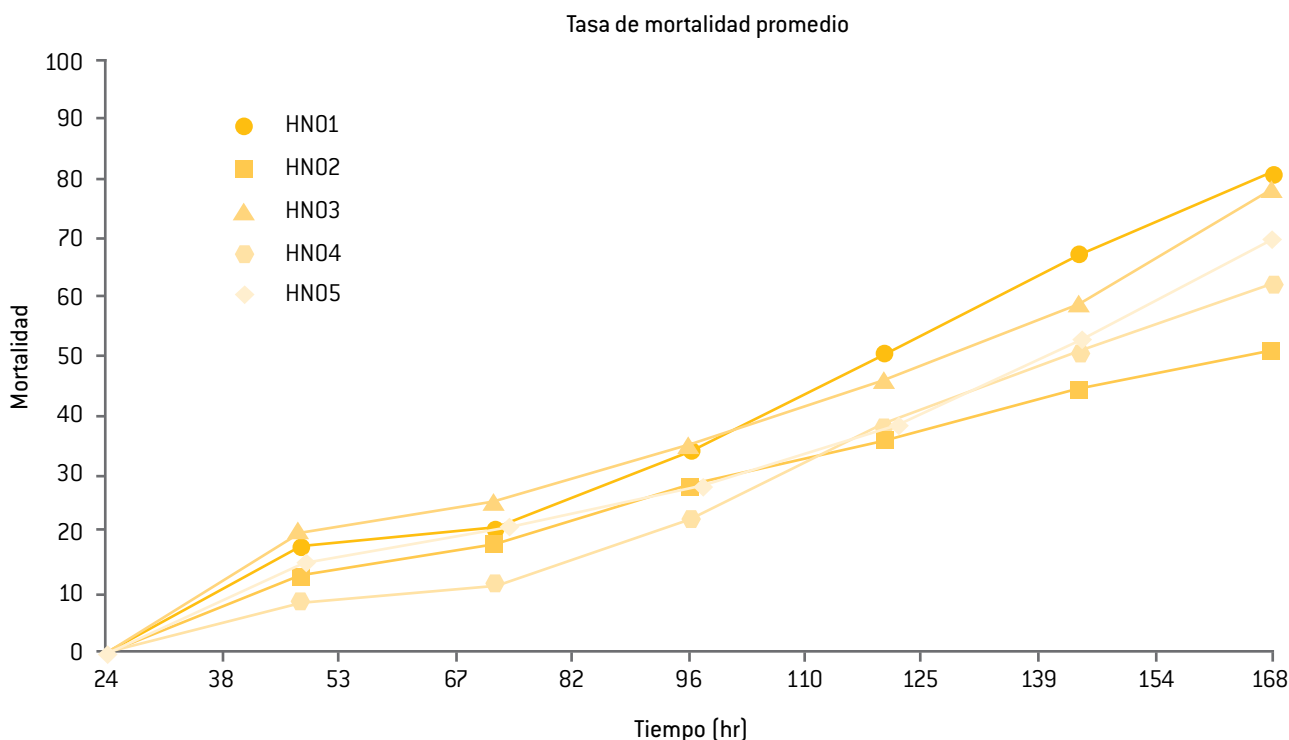


Figura 1. Comportamiento de las cepas a través del tiempo.

ción de U.F.C de *Arthrobotrys* spp. ejercieron mayor control sobre *Meloidogyne javanica*.

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad de cepas de nematófagos sobre *M. incognita*.

HN	% Mortalidad	TL50 (h)
HN01	94 A	106.07
HN02	59 E	146.53
HN03	87 B	118.24
HN04	69 D	136.98
HN05	72 C	131.88

Se lograron aislar e identificar morfológicamente cinco cepas que mostraron actividad nematicida contra los juveniles J₂ de *Meloidogyne incognita*. Con base en los resultados obtenidos del bioensayo realizado, la concentración de U.F.C de las cepas de *Arthrobotrys* spp., es muy significativo, ya que en todos los casos fueron los mejores tratamientos. La cepa HN01 fue la que causó mayor índice de mortalidad sobre *M. incognita*.

LITERATURA CITADA

- BARKER, K. R., & Koenning, S. R. (1998). Developing sustainable systems for nematode management. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 165-205.
- CARPENTER, J., Lynch, L., & Trout, T. (2001). Township limits on 1,3-D will impact adjustment to methyl bromide phase-out. *California Agriculture*, 55, 12-18.
- CHITWOOD, D. J. (2003). Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. *Pest Management Science*, 59, 748-753.
- DÁVILA, L. (2005). Evaluación de la actividad biocontroladora de *Arthrobotrys* sp. y *Paecilomyces* sp. sobre *Meloidogyne javanica* in vitro y bajo condiciones de invernadero en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Anderson). Agronomía colombiana.
- EILENBERG, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Bio-Control*, 46, 387-400.
- GAMS, W., & Zare, R. (2003). A taxonomic review of the clavicipitaceous anamorphs parasitizing nematodes and other microinvertebrates. In J. F. White Jr., C. W. Bacon, N. L.
- GUTIÉRREZ, A. & Mendoza, P. (2013). Hongos nematófagos (Orbiliales) capturando, destruyendo y alimentándose de larvas hisotrópicas de *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Revista Mexicana de Micología*.
- HUGOT, J. P., Baujard, P., & Morand, S. (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: An overview. *Nematology*, 3, 199-208.
- HYWEL-JONES & J. W. Spatafora (Eds.), *Clavicipitalean fungi: Evolutionary biology, chemistry, and cultural impacts*. New York: Marcel Dekker.
- JAFFEE, B., & Strong, D. (2005). Strong bottom-up and weak top-down effects in soil: Nematodeparasitized insects and nematode-trapping fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1011-1021.
- MITSUI, Y. (1985). Distribution and ecology of nematode-trapping fungi in Japan. *JARQ*, 18, 182-193.
- MOLINARI, S. (2011). Natural genetic and induced plant resistance, as a control strategy to plantparasitic nematodes alternative to pesticides. *Plant Cell Reports*, 30, 311-323.
- NORDBRING-HERTZ, B., Jansson, H. B., & Tunlid, A. (2006). *Nematophagous fungi*. In *Encyclopedia of life sciences*. Chichester: John Wiley & Sons.
- PARK, J., Gams, W., Scholler, M., Ghisalberti, E., & Sivasithamparam, K. (2002). Orbiliaceous nematode-trapping fungi and related species in Western Australia and their biological activities. *Australasian Mycologist*, 21, 45-52.
- PERSMARK, L., & Jansson, H. B. (1997). Nematophagous fungi in the rhizosphere of agricultural crops. *FEMS Microbiology Ecology*, 22, 303-312.
- SASSER, J. N. (1980). Root-knot nematodes: A global menace to crop production. *Plant Disease*, 64, 36-41.
- TIAN, B. Y., Yang, J. K., & Zhang, K. Q. (2007). Bacteria used in the biological control of plantparasitic nematodes: Populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*, 61, 197-213.
- ZHANG, Y., Li, G. H., & Zhang, K. Q. (2011). A review on the research of nematophagous fungal species (In Chinese). *Mycosystema*, 30, 836-845.
- ZOFF, W. (1888). Zur Kenntnis der Infektionskrankheiten niederer Thiere und Pflanzen. Nova Academy of Caes. Leop. German. Nat. Cur, 52, 314-376.