

RESEARCH/INVESTIGACIÓN

CONTROL BIOLÓGICO DE *NACOBBUS ABERRANS* MEDIANTE HONGOS ANTAGONISTAS

M. A. Cortez-Hernández¹, R. I. Rojas-Martínez¹, J. Pérez-Moreno²,
V. Ayala-Escobar¹, M. Silva-Valenzuela¹, y E. Zavaleta-Mejía^{1*}

¹Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México-
Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230; ²Posgrado en Edafología, Colegio de
Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México,
C.P. 56230. *Autor para correspondencia: zavaleta@colpos.mx

RESUMEN

Cortez-Hernández, M. A., R. I. Rojas-Martínez, J. Pérez-Moreno, V. Ayala-Escobar, M. Silva-Valenzuela,
y E. Zavaleta-Mejía. 2019. Control biológico de *Nacobbus aberrans* mediante hongos antagonistas.
Nematropica 49:140-151.

Nacobbus aberrans (Thorne) Thorne y Allen, es considerado como uno de los 10 principales fitonematodos de mayor importancia a nivel mundial. Su control se realiza mediante la aplicación de nematicidas fumigantes y no fumigantes que son costosos y dañan al ambiente; entre las alternativas de manejo amigables con el ambiente está el control biológico. En la presente investigación se evaluó el potencial de 22 hongos aislados de huevos de *Meloidogyne* sp. como agentes de control biológico de *N. aberrans*. Se probó *in vitro* el parasitismo sobre huevos y juveniles de segundo estadio (J2). Los aislamientos que se destacaron fueron: *Fusarium solani* (Fs03), *F. oxysporum* (Fo07 y Fo10) y *Penicillium janthinellum* (Pe11) que causaron 86 y 90%, 84 y 86%, 89 y 91%, y 75 y 78% de parasitismo en huevos y J2 de *N. aberrans*, respectivamente. Cuando se probó la patogenicidad de estos aislamientos en pimiento (*Capsicum annuum*) cv. Yolo Wonder, solamente Fs03 y Pe11 no fueron patogénicos. En tres ensayos realizados con estos dos aislamientos en plantas de pimiento desarrolladas en suelo infestado con el nematodo, se encontró que *P. janthinellum* (Pe11) redujo de manera significativa ($P \leq 0.05$) el agallamiento radical (9-49%) y el número de J2/g de raíz (35-56%) en comparación con las plantas expuestas sólo al nematodo; y con *F. solani* (Fs03), únicamente en dos de los tres ensayos realizados existió una reducción significativa del 12-26% y de 16-41% en el agallamiento radical y el número de J2 en raíz, respectivamente. En general no se observó un efecto consistente de promoción de crecimiento de las plantas (peso seco de la raíz y del follaje) cuando se inocularon sólo con los hongos o con la combinación hongo-nematodo. Los mejores resultados se obtuvieron con *P. janthinellum* (Pe11), cuyo potencial como agente de control biológico, tendrá que demostrarse en ensayos en campos e invernaderos infestados con *N. aberrans*.

Palabras clave: Control biológico, hongos nematófagos, nematodo falso agallador

ABSTRACT

Cortez-Hernández, M. A., R. I. Rojas-Martínez, J. Pérez-Moreno, V. Ayala-Escobar, M. Silva-Valenzuela,
and E. Zavaleta-Mejía. 2019. Biological control of *Nacobbus aberrans* by antagonistic fungi. *Nematropica*
49:140-151.

Nacobbus aberrans (Thorne) Thorne and Allen, is considered one of the 10 most important plant-parasitic nematodes around the world. Control is achieved through the application of fumigant and non-fumigant nematicides, which are expensive and noxious to the environment. An environmentally friendly alternative to nematicides is biological control. In the present study, 22 fungi isolated from *Meloidogyne* sp., eggs were evaluated as biological control agents of *N. aberrans*. Its parasitism on eggs and second-stage juveniles (J2) was tested on *in vitro* assays. Best results were obtained with the isolates identified as *Fusarium solani* (Fs03), *F. oxysporum* (Fo07 and Fo10), and *Penicillium janthinellum* (Pe11), which caused 86 and 90%, 84 and 86%, 89 and 91%, and 75 and 78% parasitism on eggs and J2 of *N. aberrans*, respectively. When the pathogenicity of these isolates was tested on pepper (*Capsicum annuum*) cv. Yolo Wonder, only Fs03 and Pe11 were not pathogenic. In three assays where these two isolates were inoculated on pepper plants grown in nematode-infested soil, *P. janthinellum* (Pe11) caused a significant ($P \leq 0.05$) reduction in the root gall index (9-49%) and the number of J2/g of root (35-56%), as compared to the plants exposed only to the nematode. In assays with *F. solani* (Fs03), in two out of three assays, Fs03 significantly reduced the gall index (12-26%) and the number of J2/g of root (16-41%). In general, there was not a consistent plant growth promotion effect (dry weight of root and shoot) when plant was inoculated only with the fungi or with the combination fungi-nematode. The best results were obtained with *P. janthinellum* (Pe11) whose potential as a biological control agent has to be demonstrated in assays conducted in fields and greenhouses infested with *N. aberrans*.

Key words: Biological control, false root-knot nematode, nematophagous fungi

INTRODUCCIÓN

Entre los patógenos que afectan la producción de cultivos, se encuentran los nematodos fitoparásitos (Briar et al., 2016). *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen, es considerado como uno de los 10 principales nematodos fitoparásitos de mayor importancia a nivel mundial (Jones et al., 2013; SIAP, 2017). Las pérdidas económicas que ocasiona en los cultivos que parasita oscilan entre 30 y 80%, principalmente en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), chile (*Capsicum annum* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), entre otros (Manzanilla-López et al., 2002; Cabrera-Hidalgo et al., 2014). Los juveniles de *N. aberrans* tienen hábitos endoparásitos migratorios, mientras que las hembras adultas son endoparásitas sedentarias e inducen agallas en el sistema radical. El control de este nematodo es difícil debido a que la mayor parte de su ciclo de vida la pasa dentro en las raíces de su hospedante, donde se encuentra protegido del efecto tóxico de productos químicos y antagonistas microbianos externos (Olivares-Bernabeu et al., 2002).

Como en el caso de otros nematodos agalladores como *Meloidogyne* spp., actualmente el control de *N. aberrans* se basa principalmente en el uso de nematicidas químicos fumigantes y no fumigantes, de alto costo económico y ambiental.

Una alternativa que puede mitigar los efectos nocivos causados por los fitonematodos y fitoparásitos en general, es el uso de agentes de control biológico (Huang et al., 2015). Existe una amplia diversidad de microorganismos que en la naturaleza funcionan como antagonistas de nematodos, entre los que destacan los hongos y las bacterias. Los antagonistas de nematodos han desarrollado diversos mecanismos físicos y bioquímicos para afectarlos (Stirling, 2014). Los hongos antagonistas tienen gran potencial debido a que son habitantes comunes del suelo, presentan una gran diversidad, son abundantes, capaces de sobrevivir como saprófitos, pueden ser fácilmente cultivados *in vitro* y ser producidos masivamente para el manejo de nematodos en campo (Olivares-Bernabeu et al., 2002).

Los hongos nematófagos tienen gran capacidad para disminuir las poblaciones de nematodos dado que comparten el mismo nicho ecológico (Yang et al., 2007). Este tipo de hongos son capaces de atacar, matar y digerir nematodos (Verdejo-Lucas et al., 2002). Algunos de ellos son saprofitos facultativos, pueden atacar a otros hongos, colonizar las raíces de plantas o vivir como endófitos. Con base en el mecanismo de interacción con el nematodo se clasifican en: endoparásitos, parásitos oportunistas y depredadores o formadores de trampas (Sikora et

al., 2008; Stirling, 2014). Los hongos oportunistas son parásitos de huevos, sus hifas penetran la cubierta del huevo, inducen cambios en la permeabilidad de la cubierta y colonizan el interior; la hifa crece en la capa adyacente de quitina y lípido, y termina por colonizar el interior del huevo donde el nematodo se está desarrollando (Tunlid *et al.*, 1992; Olivares-Bernabeu *et al.*, 2002).

Se han descrito más de 700 especies de hongos controladores de nematodos pertenecientes a diferentes órdenes y familias como Ascomycetes (*Orbiliaceae* y *Claviceae*), Basidiomycetes (*Pleurotaceae*), Chytridiomycetes, Oomycetes y Zygomycetes (*Zoopagales*) (Stirling, 2014). Las especies de hongos que con más frecuencia se reportan como eficaces agentes de control biológico de huevos de nematodos han sido *Paecilomyces lilacinus* [actualmente conocido como *Purpureocillium lilacinus*] (Dossantos *et al.*, 1992; Freitas *et al.*, 1995; Lara *et al.*, 1996; Naranjo, 2008); *Arthrobotrys* spp. (Al-Hazmi *et al.*, 1982; Dossantos *et al.*, 1992; Alfaro-Gutiérrez *et al.*, 2011); *Trichoderma* spp., particularmente *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* (Morton *et al.*, 2004); *Dactylella ovoparasitica*; y *Pochonia chlamydosporia* (Hallman *et al.*, 2009).

En los países donde *N. aberrans* causa pérdidas importantes en la producción de diversos cultivos, son contadas las investigaciones que se han realizado con hongos parásitos de huevos y juveniles de este nematodo; en esas investigaciones el antagonista más utilizado ha sido *Pochonia chlamydosporia* (Hidalgo-Díaz *et al.*, 2017). Asimismo, se reporta al hongo micorrízico *Glomus intraradices* y a la bacteria *Pseudomonas protegens* como potenciales agentes de control biológico de *N. aberrans* (Lax *et al.*, 2011; Lax *et al.*, 2013). Considerando que es importante ampliar la diversidad de antagonistas que pudieran actuar como agentes de control biológico del nematodo falso agallador, la presente investigación tuvo por objetivo evaluar el potencial de hongos aislados de huevos de *Meloidogyne* sp. en el control de *N. aberrans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de hongos parásitos

Se extrajeron masas de huevos en raíces de plantas de tomate infectadas con *Meloidogyne* sp., provenientes de invernaderos y campos del Valle

del Fuerte, Sinaloa (México). Las masas de huevos se lavaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% durante 2 min y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril para quitar el exceso de NaClO. Los huevos extraídos se depositaron en un tubo Eppendorf con 1.5 ml de agua estéril, de esta suspensión se tomaron alícuotas de 250 μ l, se distribuyeron en cajas Petri con Agua-Agar e incubaron por 24 hr a 26°C. Los huevos que mostraron crecimiento micelial se transfirieron individualmente a cajas Petri con Papa-Dextrosa-Agar (PDA) con cloranfenicol al 0.1% (p/v). Posteriormente, de estas cajas se tomaron puntas de hifas que se sembraron en PDA sin antibiótico (Olivares-Bernabeu *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2006; Giné *et al.*, 2013; Giné *et al.*, 2016). Se realizaron montajes semipermanentes para la observación y medición de estructuras (micelio, conidios y conidióforos) y con ayuda de las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972) y Leslie y Summerel (2006) se llevó a cabo la identificación. Para los hongos que mostraron mayor capacidad parasítica en los ensayos *in vitro*, también se llevó a cabo la identificación molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando los iniciadores universales ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4R (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Las secuencias obtenidas se analizaron con el software BioEdit y mediante la herramienta Blast del National Center Biotechnology Information (NCBI) se determinó su identidad comparando con secuencias reportadas.

Selección de hongos con potencial parasítico sobre huevos y juveniles (J2) de N. aberrans

De la colonia de cada hongo se tomó un fragmento de alrededor de 1 cm², se depositó en un tubo Eppendorf con 1 ml de agua estéril. Se agitó en el vórtex durante 60 sec y se preparó una suspensión conteniendo 1×10^3 conidios/ml.

Los huevos y juveniles (J2) se obtuvieron de raíces de plantas de chile y tomate cultivadas en contenedores infestados con *N. aberrans*. Las raíces se lavaron con agua corriente y se cortaron; las masas de huevos se extrajeron manualmente y se depositaron en un tubo con 1 ml de agua con cloranfenicol al 0.01% (Villar-Luna *et al.*, 2009). Para disgregar los huevos de las masas se agregó 1 ml de NaClO al 0.53% a la suspensión de masas y

se agitó durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó por 2 min a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante y nuevamente se agregó 1 ml de agua estéril. El paso se repitió hasta eliminar las trazas de NaClO. Para obtener los J2, los huevos se pusieron sobre papel de filtro sostenido por una malla colocada en una caja Petri conteniendo agua estéril y se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 hr. Los juveniles obtenidos se concentraron en una suspensión cuyo volumen se ajustó para obtener el número de J2 por ml necesario para realizar los ensayos (Villar-Luna et al., 2009).

En la cavidad de un portaobjeto excavado se colocaron 30 μl de agua destilada estéril conteniendo 25 huevos y a continuación se adicionaron 25 μl de una suspensión de 1×10^3 conidios/ml del hongo. Los portaobjetos se mantuvieron dentro de una cámara húmeda a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 6 días, al cabo de los cuales se registró el porcentaje de huevos parasitados en cada una de las réplicas ($n=4$). Se probaron 22 aislamientos de hongos y la prueba se repitió una vez más. Se seleccionaron los hongos que mostraron un parasitismo mayor a 80% y se realizó un ensayo con huevos y otro con J2 siguiendo la metodología anterior, excepto que en estos ensayos se tuvieron 10 repeticiones por tratamiento y cada ensayo se repitió una vez más.

Pruebas con pimiento

Con los aislamientos más eficientes se realizaron evaluaciones de patogenicidad sobre pimiento. Las semillas del cv. Yolo Wonder se germinaron en charolas germinadoras con 20 g de vermiculita (AGROLita®) y Peat Moss (marca FLX. PROMIX®) mezclados en proporción 1:1. Las plántulas con dos hojas verdaderas se trasplantaron en macetas conteniendo 100 g suelo estéril (una plántula por maceta) y se mantuvieron en cámara de crecimiento a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo 12 hr luz/obscuridad. El riego se realizó cada tercer día con agua estéril y semanalmente se fertilizó con solución nutritiva (1 g de Nitrofoska®/litro de agua). Se realizaron tres inoculaciones con 3 ml de una suspensión de 1×10^6 conidios/ml por planta; la primera, una semana antes del trasplante, la segunda un día previo al trasplante y la tercera a los 15 días después del trasplante. Cada tratamiento y el testigo constaron de 15 plantas. Durante 30 días se hicieron observaciones para registrar la presencia de algún síntoma aéreo y al cabo de este

tiempo se evaluó el porcentaje de plantas muertas. El ensayo se repitió una vez más.

Con los hongos que no resultaron ser patógenos para pimiento, se realizaron tres ensayos para evaluar su potencial como organismos de control biológico de *N. aberrans*; en el primero se utilizó suelo infestado de contenedores en los que se mantiene el inóculo de *N. aberrans* y en los otros dos se mezcló suelo infestado y arena estéril en una proporción 1:1. No se determinó el nivel de población inicial del nematodo en el suelo infestado. Las plantas de pimiento se obtuvieron como se describió arriba, se trasplantaron en macetas conteniendo 250 g de cada sustrato. Se utilizaron los aislamientos de hongos que no mostraron patogenicidad en pimiento y la inoculación se realizó de la manera descrita con anterioridad. En cada ensayo se establecieron seis tratamientos: un testigo con suelo estéril, dos tratamientos sólo con el hongo correspondiente, uno sólo con nematodo y dos con la combinación del nematodo con cada hongo. Cada tratamiento constó de 10 macetas con dos plantas y se mantuvieron bajo las condiciones mencionadas con anterioridad. A las 6 semanas después del trasplante se registró: índice de agallamiento radical de acuerdo a la escala propuesta por Daulton y Nusbaum (1961); número de J2/g de raíz (Cristóbal et al., 2006); la necrosis radical con una escala arbitraria de 1 a 4 (donde 1 = 0–10% de raíces necrosadas, 2 = 11–25% de raíces necrosadas, 3 = 26–50% de raíces necrosadas y 4 = más del 50% de raíces necrosadas); peso seco de la parte aérea y de la raíz.

Análisis estadístico

Previo a los análisis, se verificó que las variables cumplieran con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Cuando el análisis de varianza indicó diferencias significativas entre tratamientos, se procedió a realizar la comparación de medias con la prueba Tukey ($\alpha = 0.05$). Se utilizó el programa estadístico R versión 3.5.1. (R Core Team, 2015).

Microscopía electrónica de barrido (MEB) de huevos parasitados

Alrededor de 1000 huevos de *N. aberrans* contenidos en 1 ml de agua estéril se inocularon con 1000 μl de una suspensión de 1×10^3

conidios/ml del hongo; 4 días después se fijaron con glutaraldehído a 2.5% por 24 hr. Después de deshidratarlos se secaron mediante punto crítico de CO² (SONDRI -780A simple critical point dryer), enseguida se cubrieron con una película de oro/paladio (80/20) por 90 s (Fine Coat, ion sputter JFC 1100) y se observaron al microscopio electrónico de barrido marca JEOL, modelo JSM-6390. Se tomaron fotografías digitales con el programa MEB: SEM Control User Interface, versión 8.3.

RESULTADOS

Aislamiento y selección de hongos parásitos

De las raíces procesadas se obtuvieron 16 aislamientos de *Fusarium* spp., tres de *Gliocladium* spp., dos de *Penicillium* spp. y uno de *Trichoderma* sp. La identificación molecular solamente se hizo para los tres aislamientos que destacaron en las pruebas *in vitro* y la comparación de sus secuencias con la base de datos del NCBI-BLAST permitió confirmar la identidad de *F. oxysporum* (Fo10: número de acceso MK571196 y Fo07: número de acceso Mk571185), *F. solani* (Fs03: número de acceso Mk571197) y *Penicillium janthinellum* (Pe11: número de acceso MK560082).

De los hongos probados se destacó *Gliocladium* sp. (GL14) con 100% de parasitismo sobre huevos de *N. aberrans*, seguido de *P. janthinellum* (Pe11) y *Gliocladium* sp. (GL13 y GL16) con el 97%. Por otra parte, *F. oxysporum* (Fo10) y *Penicillium* sp. (Pe15) parasitaron el 93% de los huevos mientras que en el caso de *F. solani* (Fs03) y *F. oxysporum* (Fs07) fue del 83% y 81%, respectivamente.

En las siguientes pruebas realizadas ya no se utilizó el aislamiento GL14 debido a que se contaminó y ya no pudo ser recuperado. En los ensayos con los hongos seleccionados, el mayor porcentaje de huevos parasitados se obtuvo con los aislamientos Fo10 (89%) y Fs03 (86%), Fo07 (84%) y Pe11 (75%), en comparación con los tratamientos Pe15 (51%), GL16 (49%) y GL13 (46%). En el parasitismo de J2 destacaron los tratamientos Fo10 (91%) y Fs03 (90%), Fo07 (86%) y Pe11 (78%) y Pe15 (53%) (Fig. 1). Considerando estos resultados, los aislamientos Fo10, Fs03, Fo07 y Pe11 fueron seleccionados para realizar las pruebas de patogenicidad en pimiento.

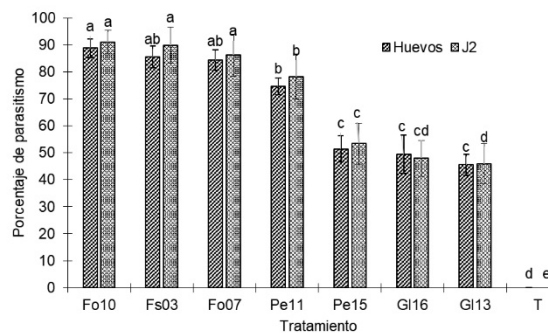


Figura 1. Porcentaje de parasitismo de siete aislamientos de hongos sobre huevos y J2 de *Nacobbus aberrans*: T: testigo sin hongo; Fo: *Fusarium oxysporum*; Fs: *Fusarium solani*; Pe: *Penicillium* sp.; y GL: *Gliocladium* sp. Cada barra representa el promedio de 20 repeticiones correspondientes a los dos ensayos realizados. Para cada estadio barras con la misma letra no difieren significativamente (Tukey, $P < 0.05$).

Pruebas en pimiento

De los cuatro aislamientos inoculadas en pimiento, los dos de *F. oxysporum* (Fo07 y Fo10) se comportaron como fitopatógenos provocando la muerte del 100% de las plantas, mientras que Fs03 y Pe11 no causaron síntomas, razón por la cual fueron seleccionados para los ensayos con *N. aberrans*.

Solamente con *P. janthinellum* Pe11 se redujo de manera significativa en los tres ensayos el agallamiento radical (de 9 a 49%) y el número de J2 (de 35 a 56%) de *N. aberrans* en comparación con las plantas expuestas sólo al nematodo (N). Con *F. solani* Fs03 en dos de los ensayos las reducciones fueron de 12 a 26% y de 16 a 41% en el agallamiento radical y el número de J2, respectivamente. De igual manera en el necrosamiento radical, solo en el primer ensayo se encontró una reducción de 34 a 55% en los tratamientos con *N. aberrans* en combinación con Fs03 y Pe11, respectivamente. En general no se observó un efecto consistente de promoción de crecimiento de las plantas (peso seco de la raíz y del follaje) cuando se inocularon sólo con los hongos o con la combinación hongo-nematodo (Cuadro 1).

Microscopía electrónica de barrido (MEB) de huevos parasitados

Cuadro 1. Efecto de la inoculación con *Fusarium solani* (Fs03) y *Penicillium janthinellum* (Pe11) en plantas de pimiento cv. Yolo Wonder desarrolladas en suelo infestado con *Nacobbus aberrans*.

	IA ^q	NR ^r	PSF (g) ^s	PSR (g) ^t	J2/g R ^u
Primer Ensayo					
T ^v	0.00±0c ^w	1.00±0b	0.76±0.19a	0.30±0.1a	0±0d
Fs03 ^x	0.00±0c	1.00±0b	0.70±0.05a	0.28±0.03a	0±0d
Pe11 ^y	0.00±0c	1.00±0b	0.75±0.08a	0.31±0.07a	0±0d
N ^z	86.25±1.62a	2.35±1.0a	0.29±0.02b	0.25±0.04a	865±99a
N+Fs03	85.50±0.89a	1.55±0.8b	0.28±0.07b	0.27±0.06a	727±88b
N+Pe11	78.50±4.67b	1.05±0.15b	0.29±0.04b	0.23±0.04a	376±49c
Segundo Ensayo					
T	0.00±0d	1.00±0a	0.50±0.11a	0.30±0.04a	0±0d
Fs03	0.00±0d	1.00±0a	0.43±0.06a	0.25±0.06abc	0±0d
Pe11	0.00±0d	1.00±0a	0.46±0.06a	0.26±0.03ab	0±0d
N	71.18±3.99a	1.50±0.70a	0.20±0.03b	0.19±0.05c	1745±126a
N+Fs03	62.44±6.42b	1.05±0.16a	0.23±0.04b	0.20±0.04bc	1020±34b
N+Pe11	36.3±7.35c	1.4±0.65a	0.26±0.05b	0.21±0.05bc	802±10c
Tercer Ensayo					
T	0.00±0c	1.00±0b	0.27±0.04b	0.07±0.02a	0±0c
Fs03	0.00±0c	1.00±0b	0.40±0.04a	0.12±0.03a	0±0c
Pe11	0.00±0c	1.00±0b	0.36±0.06a	0.10±0.03a	0±0c
N	94.00±7.10a	1.30±0.70a	0.11±0.02c	0.09±0.30a	1604±171a
N+Fs03	69.50±6.00b	1.20±0.16ab	0.11±0.02c	0.10±0.11a	1491±116a
N+Pe11	68.75±5.37b	1.15±0.65ab	0.13±0.03c	0.10±0.02a	1043±167b

^qIA: índice de agallamiento (Daulton y Nusbaum, 1961)^rNR: necrosis radical^sPSF: peso seco del follaje^tPSR: peso seco de la raíz^uR: número de J2/g de raíz^vT: testigo sin nematodo ni hongo^wcifras en cada columna seguida por la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).^xFs: inoculación con *F. solani*^yPe: inoculación con *P. janthinellum*. Medias representan el promedio de 10 repeticiones^zN: suelo infestado con *N. aberrans*

Las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica evidenciaron la relación parasítica de los hongos *F. solani* (Fs03) y *P. janthinellum* (Pe11), observándose la germinación de los conidios, la presencia de secreciones adhesivas a partir de las hifas que colonizaron la superficie del huevo, el recubrimiento total del huevo por el micelio del hongo, así como el rompimiento de la cascara del huevo y la

destrucción de éste (Fig. 2 y 3).

DISCUSIÓN

Los hongos aislados de raíces agalladas de plantas de tomate infectadas con *Meloidogyne* sp., correspondieron a especies de los géneros *Fusarium*, *Gliocladium*, *Trichoderma* y *Penicillium*. Los primeros tres géneros se han

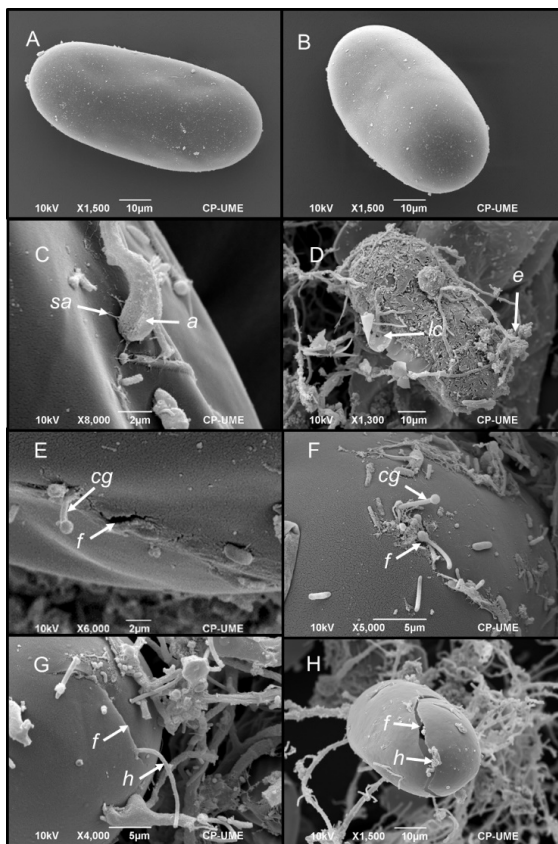


Figura 2. Microscopia electrónica de barrido de huevos de *Nacobbus aberrans* parasitados por *Fusarium solani* (Fs03). (A y B) Testigo. (C) Ensanchamiento de la punta de la hifa (similar a un apresorio, *a*) con secreciones adhesivas (*sa*) sobre la superficie (cáscara) del huevo. (D) Infección avanzada del huevo por *F. solani* (Fs03) donde se observan estructuras similares a laminillas desprendiéndose de la cáscara (*lc*) y micelio del hongo esporulando (*e*). (E y F) Fractura (*f*) de la cáscara y conidios germinados (*cg*). (G y H) Huevos con fracturas (*f*) de donde aparentemente están emergiendo hifas (*h*).

registrado como parásitos de los nematodos agalladores con mayor frecuencia (Godoy *et al.*, 1982; Morgan-Jones *et al.*, 1984; Sun *et al.*, 2006; Aminuzzaman *et al.*, 2018). *Fusarium* ha sido considerado como enemigo natural de nematodos fitopatógeno (Peraza-Padilla *et al.*, 2011; Sánchez-Portillo *et al.*, 2016) En Almería y Barcelona, España, Verdejo-Lucas *et al.* (2002) reportaron que aislaron e identificaron diferentes especies de *Fusarium* (*F. solani*, *F. oxysporum* y *Fusarium* sp.) que parasitaron hembras y huevos de *Meloidogyne* spp., lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación en relación

a los aislamientos y ensayos *in vitro* en huevos y J2 de *N. aberrans*. *Gliocladium* (GL16 y GL13) mostró menor eficacia; al respecto Godoy *et al.* (1982) mencionan que su parasitismo en huevos de *M. arenaria* fue sólo de 5 a 12%. *Trichoderma* también se aisló en este estudio, pero se descartó porque en el ensayo de selección solamente parasitó 50% de los huevos del nematodo. El género *Trichoderma* se ha considerado como un patógeno importante de huevos de nematodos agalladores; diferentes especies se comercializan debido a su eficacia como agente de control biológico de varios fitopatógenos, producen metabolitos que inhiben el desarrollo de otros organismos, protegen a la rizosfera al establecer una relación simbiótica con la planta, producen quitinasas y proteasas que degradan las paredes de los huevos y facilitan la entrada de las hifas (Morton *et al.*, 2004; Del Castillo *et al.*, 2014). Sin embargo, existe una amplia variación en la capacidad antagónica entre los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp., de modo que no todos son tan eficaces (Martínez *et al.*, 2013a; Hernández-Ochandía *et al.*, 2015)

El aislamiento de *Penicillium* aislado de huevos de *Meloidogyne* sp., en el presente estudio correspondió de acuerdo al análisis molecular a *P. janthinellum*, que es ampliamente conocido por su capacidad de solubilizar el fosfato fijado a las arcillas del suelo y comercializado como biofertilizante (Núñez y Acevedo, 2005; Rojas-Sierra y Moreno-Sarmiento, 2008). También se reconoce como un endófito que produce giberelinas, promueve el crecimiento de tomate, activa los mecanismos de defensa y protege a las plantas del estrés por factores abióticos (Khan *et al.*, 2013; Leitão y Enguita, 2016). En comparación con los otros géneros de hongos parásitos de nematodos mencionados con anterioridad, es relativamente escasa la información que se encuentra en la literatura acerca del parasitismo de especies del género *Penicillium* en nematodos fitoparásitos. En un trabajo realizado por Utkhede *et al.* (1992), encontraron que la cepa 22 de *P. janthinellum* redujo la reproducción de *Pratylenchus penetrans* en plántulas de manzana cv. McIntosh. En Alabama la supresión de *Meloidogyne* spp., se atribuyó en parte al incremento en las poblaciones de especies de *Penicillium* como *P. janthinellum*, que junto con otros microorganismos del suelo se incrementaron

con la siembra de la leguminosa *Mucuna deeringiana* (Vargas-Ayala et al., 2000). Eapen et al. (2005) reportaron que *P. digitatum* suprimió hasta en 100% la eclosión de *M. incognita in vitro*. El hongo *P. oxalicum* disminuyó la eclosión de juveniles de *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis* en un rango de 30.9% y 98.6% (Martínez-Beringola et al., 2013). En un reporte reciente se menciona que *P. janthinellum* no parasitó a *Radopholus similis*, *Meloidogyne incognita* ni a *M. exigua* (Varela-Benavides et al., 2017). La escasa información acerca del parasitismo de *Penicillium* en nematodos, podría deberse a que no se le ha considerado como un potencial agente de control biológico de nematodos o que debido a su similitud morfológica con *Paecilomyces* (= *Purpureocillium*), en algunos reportes de parasitismo sobre nematodos, pudiera haber sido confundido.

Los filtrados de los cultivos de los aislamientos de *F. oxysporum*, *F. solani*, *P. janthinellum* y *Gliocladium* sp., no tuvieron ningún efecto sobre los huevos y los J2 de *N. aberrans* (datos no mostrados). La producción de metabolitos tóxicos contra nematodos ha sido consignada para diferentes especies de hongos antagonistas como *Gliocladium fimbriatum* y *G. viren*, que producen gliotoxina y virina, respetivamente (Li y Zhang, 2014); y *F. oxysporum* cepa 162 que produce metabolitos tóxicos que causan hasta 100 % de mortalidad de los juveniles de *M. incognita* (Hallman y Sikora, 1996). Así mismo, Li y Zhang (2014) mencionaron que especies del género *Penicillium* producen metabolitos tóxicos a *M. incognita*, *Bursaphelenchus xylophilus* y *Pratylenchus penetrans*. La producción de metabolitos tóxicos depende del aislamiento, del tipo de medio en el que se crece hongo, el tiempo y las condiciones de incubación (temperatura), y el pH del medio (Peraza-Padilla et al., 2011; Sharma et al., 2014). Los resultados negativos obtenidos en la presente investigación pudieran deberse a que no se cumplió con alguno de los factores mencionados.

El parasitismo de *F. solani* (Fs03) y *P. janthinellum* (Pe11) sobre los huevos de *N. aberrans* fue evidenciado con microscopio electrónico de barrido. Las observaciones realizadas sugieren que las hifas de los hongos en contacto con la superficie del huevo desarrollaron apresorios y produjeron un material fibrilar (Fig. 2C-D y 3A) como ha sido reportado para otros

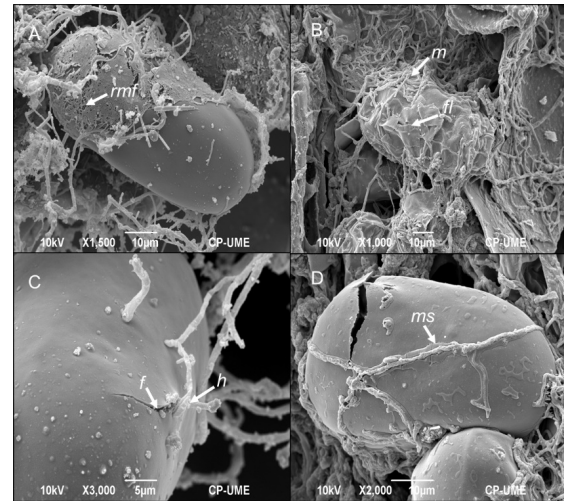


Figura 3. Microscopia electrónica de barrido de huevos de *Nacobbus aberrans* parasitados por *Penicillium janthinellum* (Pe11). (A) Huevo colonizado por el hongo y cubierto por una fina red de material fibrilar (rmf). (B) Huevos colapsados y con abundante crecimiento micelial (m) mostrando el desprendimiento de fragmentos laminares (fl) de la cáscara. (C) Huevo con fracturas (f) de donde aparentemente están emergiendo hifas (h). (D) Hifas creciendo sobre el huevo y rodeadas por un material probablemente secretado por ellas (ms).

hongos como *Pochonia chlamydosporia* sobre huevos de *M. incognita* (Manzanilla-López et al., 2014) y *Taenia saginata* (Araújo et al., 2009). También se observó el rompimiento de los huevos [Fig. 2 E-H y 3 C-D] similar al reportado por Leguizamón y Padilla 2001, en huevos de *Meloidogyne* spp. por acción de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Los huevos con un alto grado de invasión por el hongo mostraron degradación, deformación y colapso (Fig. 2D y 3B).

CONCLUSIÓN

Los aislamientos de *F. solani* Fs0 y *P. janthinellum* Pe11 mostraron un alto grado de parasitismo sobre los J2 y huevos de *N. aberrans* en condiciones *in vitro*, no fueron patogénicos en plantas de pimiento, las protegieron contra el ataque del nematodo y redujeron el número de J2 en las raíces. Los mejores resultados se obtuvieron con *P. janthinellum* (Pe11), cuyo potencial como agente de control biológico, tendrá que demostrarse en ensayos en campos e invernaderos

infestados con el nematodo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al primer autor para realizar sus estudios de maestría.

LITERATURA CITADA

- Alfaro-Gutiérrez, I. C., P. Mendoza-de Gives, E. Liébano-Hernández, M. E. López-Arellano, and V. M. Hernández-Velázquez. 2011. Nematophagous fungi (Orbiliales) capturing, destroying and feeding on the histotrophic larvae of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Revista Mexicana de Micología* 33:29-35.
- Al-Hazmi, A. S., D. P. Schmitt, and J. N. Sasser. 1982. The effect of *Arthrobotrys conoides* on *Meloidogyne incognita* population densities in corn as influenced by temperature, fungus inoculum density, and time of fungus introduction in the soil. *Journal of Nematology* 14:168-173.
- Aminuzzaman, F. M., S. N. Jahan, J. Shammi, A. I. Mitu, and X. Z. Liu. 2018. Isolation and screening of fungi associated with eggs and females of root-knot nematodes and their biocontrol potential against *Meloidogyne incognita* in Bangladesh. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 51:1-21.
- Araújo, J. M., J. V. Araújo, F. R. Braga, R. O. Carvalho, A. R. Silva, and A. K. Campos. 2009. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. *Experimental Parasitology* 121:338-341.
- Barnett, H. L., and B. Hunter. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3rd Edition. EUA: Burgess Publishing Company.
- Briar, S. S., D. Wichman, and G. V. Reddy. 2016. Plant-parasitic nematode problems in organic agriculture. Pp. 107-122 in Nandwani, D. (ed.) *Organic farming for sustainable agriculture, sustainable development and biodiversity* 9. Switzerland: Springer. DOI 10.1007/978-3-319-26803-3_5.
- Cabrera-Hidalgo, A. J., G. Valdovinos-Ponce, G. Mora-Aguilera, A. Rebollar-Alviter, y N. Marbán- Mendoza. 2014. Ocurrencia de *Nacobbus aberrans* en cultivos hortícolas del noroeste de Michoacán. *Nematropica* 44:107-117.
- Cristóbal, A. J., P. E. Herrera, O. V. Reyes, S. E. Ruíz, S. J. M. Tun, y R. T. R. Celis. 2006. *Glomus intraradices* para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood en condiciones protegidas. *Fitosanidad* 14:25-29.
- Daulton, R. C., and C. J. Nusbaum. 1961. The effect of soil temperature on the survival of the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. *Nematologica* 6:280-94.
- Del Castillo-Algarate, O., C. Collantes-Arana, G. Cox-Trigoso, and J. Wilson-Krugg. 2014. Efecto de dos especies nativas de *Trichoderma* sobre huevos y juveniles de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio. REBIOLEST. *Revista Científica de Estudiantes de la Universidad Nacional de Trujillo* 2, e24. Recuperado de <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/641>.
- Dossantos, M. A., S. Ferraz, and J. J. Muchovej. 1992. Evaluation of 20 species of fungi from Brazil for biocontrol of *Meloidogyne incognita* race-3. *Nematropica* 22:183-192.
- Eapen, S. J., B. Beena, and K. V. Ramana. 2005. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* 88:218-225.
- Freitas, L. G., S. Ferraz, and J. J. Muchovej. 1995. Effectiveness of different isolates of *Paecilomyces lilacinus* and an isolate of *Cylindrocarpon destructans* on the control of *Meloidogyne javanica*. *Nematropica* 25:109-115.
- Giné, A., M. Bonmatí, A. Sarro, A. Stchiegel, J. Valero, C. Ornat, C. Fernández, and F. J. Sorribas. 2013. Natural occurrence of fungal egg parasites of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. in organic and integrated vegetable production systems in Spain. *BioControl* 58:407-416.
- Giné, A., M. Carrasquilla, M. Martínez-Alonso, N. Gaju, and F. J. Sorribas. 2016. Characterization of soil suppressiveness to root-knot nematodes in organic horticulture in plastic greenhouse. *Frontiers in Plant Science*

- 7:1-15.
- Godoy, G., R. Rodríguez-Kábana, and G. Morgan-Jones. 1982. Parasitism of eggs of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria* by fungi isolated from cysts of *H. glycines*. *Nematropica* 12:111-119.
- Hallmann, J., and R. A. Sikora. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102:155-162.
- Hallmann, J., K. G. Davies, and R. Sikora. 2009. Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. Pp. 380-401 in Perry, R. N., M. Moens, and J. L. Starr (eds.) *Root-knot Nematodes*. Massachusetts, USA: CAB International.
- Hernández-Ochandía, D., M. G. Rodríguez, B. Peteira, I. Miranda, Y. Arias, y B. Martínez. 2015. Efecto de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg sobre el desarrollo del tomate y *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. *Revista de Protección Vegetal* 30:139-147.
- Hidalgo-Díaz, L., F. Navarro-Franco, and L. de F. Grassi. 2017. *Pochonia chlamydosporia* microbial products to manage plant-parasitic nematodes: case studies from Cuba, Mexico and Brazil. Pp. 311-342 in Manzanilla-López, R., and L. Lopez-Llorca (eds.) *Perspectives in sustainable nematode management through Pochonia chlamydosporia applications for root and rhizosphere health. Sustainability in plant and crop protection*. Switzerland: Springer.
- Huang, X., K. Zhang, Z. Yu, and G. Li. 2015. Microbial control of phytopathogenic nematodes. Pp. 155-64 in Lugtenberg, B. (ed.) *Principles of plant-microbe interactions*. Switzerland: Springer.
- Jones, J. T., A. Haegeman, E. G. Danchin, H. S. Gaur, J. Helder, M. G. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-López, J. E. Palomares-Rius, W. M. Wesemael, and R. N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14:946-961.
- Khan, A. L., M. Waqas, A. R. Khan, J. Hussain, S. M. Kang, S. A. Gilani, and B. W. Yun. 2013. Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 improves growth of ABA-deficient tomato under salinity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29:2133-2144.
- Lara, J., N. Acosta, C. Betancourt, N. Vicente, y R. Rodríguez. 1996. Control biológico de *Meloidogyne incognita* en tomate en Puerto Rico. *Nematropica* 26:143-152.
- Lax, P., Becerra, A. G., F. Soteras, M. Cabello, and M. E. Doucet. 2011. Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* in tomato plants. *Biology and Fertility of Soils* 47:591-597.
- Lax, P., N. Marro, B. Agaras, C. Valverde, M. E. Doucet, and A. Becerra. 2013. Biological control of the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* by *Pseudomonas protegens* under controlled conditions. *Crop Protection* 52:97-102.
- Leguizamón, J. E., y B. H. Padilla. 2001. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control del nematodo del nudo radical del café. *Cenicafé* 52:29-41.
- Leitão, A. L., and F. J. Enguita. 2016. Gibberellins in *Penicillium* strains: Challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. *Microbiological Research* 183:8-18.
- Leslie, J. F., and B. A. Summerell. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. 1st Edition. Ames, IA, USA: Blackwell Publishing.
- Li, G. H., and K. Q. Zhang. 2014. Nematode-toxic fungi and their nematicidal metabolites. Pp. 313-375 in Zhang, K. Q., and K. Hyde (eds.) *Nematode-trapping fungi. Fungal Diversity Research Series*. Dordrecht: Springer.
- Manzanilla-López, R. H., J. Devonshire, and E. Ward. 2014. A combined cryo-scanning electron microscopy/cryoplaning approach to study the infection of *Meloidogyne incognita* eggs by *Pochonia chlamydosporia*. *Nematology* 16:1059-1067.
- Manzanilla-López, R. H., M. A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R. N. Inserra, P. S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R. M. Souza, and K. Evans. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149-227.
- Martínez, B., D. Infante, y Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de

- plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal* 28:1-11.
- Martínez-Beringola, M. L., T. Salto, G. Vázquez, I. Larena, P. Melgarejo, and A. De Cal. 2013. *Penicillium oxalicum* reduces the number of cysts and juveniles of potato cyst nematodes. *Journal of Applied Microbiology* 115:199-206.
- Morgan-Jones, G., J. F. White, and R. Rodríguez-Kábana. 1984. Fungal parasites of *Meloidogyne incognita* in an Alabama soybean field soil. *Nematropica* 14:93-96.
- Morton, C. O., P. R. Hirsch, and B. R. Kerry. 2004. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi - a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology* 6:161-170.
- Naranjo, R. P. 2008. Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias. *Tecnología en Marcha* 21:123-132.
- Ñústez, C., y J. Acevedo. 2005. Evaluación del uso de *Penicillium janthinellum* Biourge sobre la eficiencia de la fertilización fosfórica en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. var. Diacol Capiro). *Agronomía Colombiana* 23:290-298.
- Olivares-Bernabeu, C. M., and L. V. Lopez-Llorca. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Revista Iberoamericana de Micología: Organó de la Asociación Española de Especialistas en Micología* 19:104-110.
- Peraza-Padilla, W., M. Orozco-Aceves, A. Esquivel-Hernández, G. Rivera-Coto, y F. Chaverri-Fonseca. 2011. Aislamiento e identificación de hongos nematófagos nativos de zonas arroceras de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 22:233-243.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Rojas-Sierra, J., y N. Moreno-Sarmiento. 2008. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología* 10:50-62.
- Sánchez-Portillo, J. F., G. A. Lugo-García, M. Mundo-Ocampo, A. Reyes-Olivas, I. de Leytandingan, y J. Ole-Becker. 2016. Búsqueda y aislamiento de hongos nematófagos vs *Meloidogyne* spp. en el Norte de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7:1829-1839.
- Sharma, A., S. Sharma, and M. Dalela. 2014. Nematicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* 6029 cultured on karanja cake medium. *Microbial Pathogenesis* 75:16-20.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2017. Atlas agroalimentario 2017. Pp. 231. http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp.
- Sikora, R. A., L. Pocasangre, A. zum Felde, B. Niere, T. T. Vu, and A. A. Dababat. 2008. Mutualistic endophytic fungi and in planta suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control* 46:15-23.
- Stirling, G. R. 2014. Nematophagous fungi and oomycetes. *Biological control of plant-parasitic nematodes. Encyclopedia of Life Sciences* 10:101-156.
- Sun, M. H., L. Gao, Y. X. Shi, B. J. Li, and X. Z. Liu. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. *Journal of Invertebrate Pathology* 93:22-28.
- Tunlid, A., J. Hans-Börje, and B. Nordbring-Hertz. 1992. Fungal attachment to nematodes. *Mycology Research* 96:401-412.
- Utkhede, R. S., T. C. Vrain, and J. M. Yorston. 1992. Effects of nematodes, fungi and bacteria on the growth of young apple trees grown in apple replant disease soil. *Plant and Soil* 139:1-6.
- Varela-Benavides, I., J. Durán-Mora, and T. Guzmán-Hernández. 2017. Evaluación *in vitro* de diez cepas de hongos nematófagos para el control de *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne incognita* y *Radopholus similis*. *Tecnología en Marcha* 30:27-37.
- Vargas-Ayala, R., R. Rodríguez-Kábana, G. Morgan-Jones, J. A. McInroy, and J. W. Kloepper. 2000. Shifts in soil microflora induced by velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in cropping systems to control root-knot nematodes. *Biological Control* 17:11-22.
- Verdejo-Lucas, S., C. Ornat, F. J. Sorribas, and A. Stchiegel. 2002. Species of root-knot nematodes and fungal egg parasites recovered

- from vegetables in Almería and Barcelona, Spain. *Journal of Nematology* 34:405-408.
- Villar-Luna, E., B. Reyes-Trejo, R. I. Rojas-Martínez, O. Gómez-Rodríguez, A. M. Hernández-Anguiano, and E. Zavaleta-Mejía. 2009. Hypersensitive response in foliage of chili pepper CM-334 resistant to *Phytophthora capsici* infected by *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.
- Yang, Y., E. Yang, Z. An, and L. Xingzhong. 2007. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:8379-8384.

Received:

14/11/2019

Accepted for publication:

24/V/2019

Recibido:

Aceptado para publicación: