

RESEARCH/INVESTIGACIÓN

EFFECTO DE EXTRACTOS VEGETALES EN CRUDO EN EL PARASITISMO DE *POCHONIA CHLAMYDOSPORIA* VAR. *CHLAMYDOSPORIA* SOBRE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*

Kathia Vilchis-Martínez^{*1}, Rosa Helena Manzanilla-López², Stephen John Powers³, Roberto Montes-Belmont¹

¹Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Apartado postal 24, Yautepec, Morelos CP. 62736, Mexico; ²Department of AgroEcology, Rothamsted Research, Harpenden, Herts, AL5 2JQ, UK; ³Department of Computational and Systems Biology, Rothamsted Research, Harpenden, Herts, AL5 2JQ UK. *Corresponding author: kvilchism0900@ipn.mx

ABSTRACT

Vichis-Martínez, K., R.H. Manzanilla-López, S.J. Powers, and R. Montes Belmont. 2013. Effect of the addition of crude plant extracts on the parasitism of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* on *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 43:254-260.

Two assays were conducted to assess the effect of aqueous crude extracts from six plants with properties against nematodes (*Argemone mexicana* L., *Chenopodium album* L., *Datura stramonium* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Nerium oleander* L. and *Crotalaria ochroleuca* G. Don.) on the parasitic activity of strains Pc10 and Pc341 of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, a facultative parasite of *Meloidogyne incognita* eggs. In one of the assays, a suspension of nematode eggs (1000/ml) from infested tomato roots (*Solanum lycopersicum* L. var. Tiny Tim), a conidia suspension (5.5×10^4 /ml) of *P. chlamydosporia* (strain Pc10 or Pc341) plus an aliquot of plant extract (25%) were added to yeast extract liquid medium. The medium was incubated at 26°C and was shaken at 150 rpm for up to 48 hr. Results at 24 hr and 48 hr showed that the percentage of egg parasitism was reduced and was statistically different in all treatments. *Crotalaria ochroleuca* and *N. oleander* had the lowest and the highest percentage of parasitism, respectively. Results from a second assay carried out under greenhouse conditions using sterile soil in pots, to which, 10 egg masses and chlamydo spores (5.5×10^4 /ml) were inoculated, and pots watered daily with aqueous plant crude extract (25%), showed that 12 days after inoculation there was an increase in parasitic fungus activity for all treatments.

Key words: aqueous plant extracts, *Crotalaria*, *Nerium oleander*, root-knot nematodes control

RESUMEN

Vichis-Martínez, K., R.H. Manzanilla-López, S.J. Powers, and R. Montes Belmont. 2013. Efecto de la aplicación de extractos vegetales en crudo en el parasitismo de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* sobre *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 43:254-260.

Se realizaron dos ensayos para evaluar el efecto de extractos vegetales acuosos en crudo de seis especies de plantas con propiedades contra nematodos: *Argemone mexicana* L., *Chenopodium album* L., *Datura stramonium* L., *Nerium oleander* L., *Raphanus raphanistrum* L. y *Crotalaria ochroleuca* G. Don. en la actividad parasítica de las cepas Pc341 y Pc10 del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, parásito facultativo de huevos de *Meloidogyne incognita*. En uno de los ensayos se incorporaron una suspensión de 1000 huevos/ml del nematodo provenientes de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L. var. Tiny Tim) infectadas con el nematodo, una suspensión de conidias (5.5×10^4 /ml) y una alícuota de extracto vegetal en crudo (25%) a un medio líquido a base de extracto de levadura. El medio se incubó a 26°C en agitación constante a 150 rpm por 48 hr. Los resultados obtenidos a las 24 y 48 hr mostraron que el porcentaje de parasitismo en los huevos se redujo y fue estadísticamente diferente en todos los tratamientos. Los extractos de *C. ochroleuca* y *N. oleander* fueron los tratamientos con el menor y el mayor porcentaje de parasitismo respectivamente. Los resultados del segundo ensayo realizado bajo condiciones de invernadero, usando suelo estéril en macetas inoculadas individualmente con 10 masas de huevos del nematodo y clamidosporas (5.5×10^4 /ml) y regadas diariamente con extracto vegetal en crudo (25%), mostraron a los 12 días posteriores a la inoculación un aumento de la actividad parasítica del hongo en todos los tratamientos.

Palabras clave: control de nematodos agalladores, *Crotalaria*, extractos vegetales acuosos, *Nerium oleander*.

INTRODUCCIÓN

El nematodo agallador *Meloidogyne* Göeldi, 1887 cuenta con un amplio número de hospedantes que incluyen cultivos de importancia económica y de subsistencia (Moens *et al.*, 2009). En el estado de Morelos (México), las especies más importantes en cultivos hortícolas y frutales incluyen a *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 en cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), papaya (*Carica papaya* L.), sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), calabaza (*Cucurbita pepo* L.), jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), plátano (*Musa sapientum* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.) y a *M. arenaria* Chitwood, 1949 en jitomate y cacahuete (Montes-Belmont, 2000; Cid del Prado *et al.*, 2001). Para su control se ha recurrido principalmente al uso de nematicidas (Mansour, 2004), que aunque disminuyen las pérdidas en el corto plazo, son caros, altamente tóxicos y contaminantes del ambiente. Por esto, es de gran interés encontrar alternativas de control que puedan ser incluidas y combinadas con otras en un programa de manejo integrado de plagas (MIP), que además de ser eficientes sean amigables con el ambiente. Una de estas alternativas es el uso del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams, 2001, el cual es saprofito y parásito facultativo de huevos de nematodos fitopatógenos como los agalladores (*Meloidogyne* spp.), el nematodo falso-agallador (*Nacobbus aberrans* (Thorne (1935) Thorne & Allen, 1944), el nematodo reniforme (*Rotylenchulus reniformis* Lindford & Oliveira, 1940), y los formadores de quistes de los géneros *Heterodera* Schmidt, 1871 y *Globodera* Skarbilovich, 1959 (Kerry, 1995; Manzanilla-López *et al.*, 2013); la eficiencia de este hongo en el control de *Meloidogyne* spp. se ha demostrado en sistemas de producción peri-urbana (Hernández e Hidalgo-Díaz, 2008).

Otra alternativa compatible con el ambiente recomendada para el control de nematodos es la incorporación al suelo de material vegetal con propiedades nematicidas o nematostáticas (Kokalis-Burelle y Rodríguez-Kábana, 2006), en forma sólida o líquida (e.g., en extractos). Duke (2008) menciona la estructura química de 2,396 especies de plantas, de las cuales el 33% actúan contra nematodos. Estas plantas, vivas o muertas, liberan compuestos que actúan como repelentes, atrayentes, estimulantes o inhibidores de la eclosión, o bien ser nematotóxicos y por tanto influyen en la presencia de los nematodos alrededor de las plantas (Montes-Belmont y Flores-Moctezuma, 2011).

Vilchis-Martínez *et al.* (2011) evaluaron *in vitro* 22 especies de plantas con propiedades nematicidas contra *M. incognita* y demostraron que los extractos acuosos en crudo de *Argemone mexicana* L., *Chenopodium album* L., *Datura stramonium* L., *Nerium oleander* L. y *Raphanus raphanistrum* L., tuvieron un efecto nematicida, por lo que podrían ser considerados como una alternativa potencial para el control y manejo de

este nematodo.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si la aplicación de extractos vegetales acuosos en crudo de algunas de estas plantas, seleccionadas por sus propiedades antinematodos, es compatible con la aplicación conjunta del hongo *P. chlamydosporia* y si la aplicación de los extractos vegetales tiene algún efecto sobre el porcentaje de parasitismo del hongo en los huevos de *M. incognita* en medio líquido *in vitro* bajo condiciones controladas y en suelo bajo condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones de Meloidogyne incognita

Las masas de huevos de *M. incognita* utilizadas para obtener los huevos para el ensayo *in vitro* de infección en medio líquido, fueron recolectadas de raíces de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Tiny Tim), crecidas en composta 'peat moss' (turba) esterilizada y adicionada con osmocote®, e infectadas previamente (i.e., 6 a 8 semanas) con *M. incognita* y mantenidas a 25°C en el invernadero de Nematología de Rothamsted Research, UK.

Preparación del inóculo de huevos de M. incognita

La composta fue separada cuidadosamente de las raíces agalladas antes de lavarlas con agua corriente para separar las partículas de suelo de las raíces. Usando un microscopio estereoscópico (magnificación 6×), las masas de huevos se retiraron de la raíz con ayuda de pinzas de relojero y agujas de disección y se colocaron en agua destilada esterilizada contenida en un bloque excavado de vidrio (Analar®, UK). El contenido del bloque se pasó a un tubo esterilizado de centrifuga de 50 ml vol (Sterilin®, Staffs, UK), para aforar su volumen total y al cual se agregó el doble del mismo volumen de hipoclorito de sodio (NaOCl) comercial (0.5%) diluido al 75%. El tubo con su contenido se agitó en un vortex (Fisherbrand®) por 2 min. Utilizando tamices de 125, 53, 30 µm de abertura de malla, previamente esterilizados con luz ultravioleta, el residuo (huevos) se colectó en el tamiz de 30 µm, el cual se pasó a un cápsula de vidrio de fondo plano y se lavó 4 veces con agua destilada esterilizada (Esteves, 2007; Ward *et al.*, 2012). Por último los huevos se colectaron en tubos de vidrio estériles (30 ml vol.) con tapa de rosca y se mantuvieron a 4°C en el refrigerador para ser utilizados en las siguientes 24 hr.

Preparación de los extractos vegetales acuosos en crudo

Cinco de las plantas usadas en el presente trabajo: *A. mexicana*, *C. album*, *D. stramonium*, *N. oleander* y *R. raphanistrum* fueron colectadas en su etapa de floración en diversas localidades del estado de Morelos (lat. N:

18° 22' - 19° 07', long. W: 98° 37' - 99° 30'). Estas plantas fueron secadas a la sombra y pulverizadas en un molino. Con excepción de *N. oleander*, de la cual solo se procesó el follaje, cada planta de las otras especies vegetales fue pulverizada completa incluyendo tallo, hojas, flores y raíz. Posteriormente, en el laboratorio, se colocaron 25 g de polvo de cada planta en un matraz conteniendo 1 L de agua destilada estéril, los cuales se mantuvieron en cuarto frío a 4°C por un periodo de 24 hr. Cada suspensión contenida por matraz fue filtrada en papel filtro N°1 y 42 (Whatman, Filter paper, UK) antes de pasarla por un filtro esterilizado de 0.20 µm de abertura adaptado a un recipiente de 250 ml (Nalgene®, Rochester, New York, USA). La muestra en polvo de *Crotalaria ochroleuca* G. Don. (colectada en Kenia por Nessie Luambano-Nyoni) fue proporcionada por Rothamsted Research y procesada de igual manera que las otras muestras para obtener el extracto vegetal acuoso en crudo.

Cepas del hongo Pochonia chlamydosporia var. chlamydosporia

En el presente estudio se utilizaron las cepas Pc341 y Pc10 de *P. c.* var. *chlamydosporia*; Pc341 de origen mexicano y Pc10 brasileño. Ambas cepas fueron reactivadas a partir de muestras de clamidosporas y micelio secados a baja temperatura y mantenidas en ampollitas en la colección de Rothamsted Research. Las muestras de las cepas reactivadas fueron cultivadas subsecuentemente en medio de papa dextrosa agar (PDA, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England).

Preparación de inóculo del hongo

Para obtener conidias, los aislamientos del hongo fueron cultivados en cajas Petri con medio de PDA. En el caso de clamidosporas, el medio de cultivo utilizado fue harina de maíz-agar (CMA, Oxoid). En ambos casos las cajas de Petri con medio de PDA o CMA se mantuvieron en una incubadora a 25°C por dos semanas. Posteriormente, para preparar el inóculo de conidias o clamidosporas, en cada caja Petri se realizó un lavado de la superficie del medio de cultivo con 5 ml de agua destilada esterilizada, utilizando un triángulo de vidrio para desprender cuidadosamente el micelio, las conidias y clamidosporas. El producto del lavado se pasó por un tamiz esterilizado de 20 µm de apertura. El material resultante del lavado fue recolectado, ya fuese a partir del filtrado recogido en la base de una caja Petri estéril (conidias), o bien, retenido en la superficie del tamiz (clamidosporas). Cada tipo de esporas se colectó en un frasco de vidrio esterilizado con agua destilada esterilizada. La cuantificación de las esporas/ml se realizó en un hematocitómetro (Marienfeld, Germany) con ayuda de microscopio óptico (40×).

Porcentaje de parasitismo de huevos en medio líquido

Para determinar el porcentaje de huevos parasitados de *M. incognita* por *P. c.* var. *chlamydosporia*, en presencia de extractos vegetales adicionados, se usó un medio líquido a base de extracto de levadura (YEM), el cual ha sido utilizado como un método rápido y eficiente para detectar diferencias en las tasas de parasitismo de huevos de nematodos agalladores y formadores de quistes (St. Leger *et al.*, 1989; Esteves, 2009; Luambano-Nyoni, 2009; Ward *et al.*, 2012).

El diseño experimental fue en bloques al azar, con 15 tratamientos que consistieron en la combinación de las seis plantas evaluadas, los dos aislamientos del hongo y el control negativo; cada uno con cuatro replicas, además de hacerlo por duplicado. Cada unidad experimental consistió en una botella universal esterilizada de vidrio con tapa de rosca, de 25 ml de capacidad, con un volumen total de 10 ml de los cuales 4 ml fueron de YEM (0.625 mg/L) (Mikrobiologie®, Darmstadt, Germany), 4 ml de extracto vegetal crudo al 25%, 1 ml de huevos del nematodo (*circa* 1000/ml) y 1 ml de conidias (5.5×10^4 /ml). Al control se le aplicó solo YEM (8 ml) y se utilizó un control negativo conteniendo solo huevos del nematodo. Las muestras se incubaron a 26°C en agitación constante de 150 rpm (INNOVA 4000, New Brunswick Scientific, NJ, USA). Se tomaron datos del porcentaje de parasitismo a las 24 y 48 hr posteriores al montaje del ensayo, para lo cual se tomó una alícuota de 3 ml que se colocó en una cámara para contar nematodos, utilizando un microscopio Zeiss (10×). Se contaron al azar un total de 100 huevos, registrando los parasitados y no parasitados.

Los datos obtenidos del porcentaje de parasitismo se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial con el paquete estadístico GenStat versión 11 (VSN International, Ltd., Hemel Hempstead, UK), además de una comparación de medias usando la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS, $P = 0.05$). En ambos ensayos los datos no requirieron de transformación ya que se cumplió con los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza.

Efecto de los extractos vegetales sobre el parasitismo del hongo en suelo

El segundo ensayo se realizó para investigar el efecto de los extractos vegetales sobre el parasitismo de huevos de *M. incognita* por *P. c.* var. *chlamydosporia* en suelo, en el que se utilizaron las mismas especies de plantas, a excepción de *C. ochroleuca*. El diseño experimental fue en bloques al azar, usando 12 tratamientos que incluyeron los extractos de las plantas evaluadas, dos cepas del hongo y el control, cada uno con tres repeticiones. La unidad experimental consistió de un pozo de semillero de 100 cm³ de capacidad, al cual se le adicionó 50 g de suelo esterilizado (composta),

aireado, y adicionado con Osmocote®, que fue inoculado con 3 ml de una solución de clamidosporas (25×10^4 /ml) de *P. c.* var. *chlamydosporia* (Pc10 o Pc341). Para cuantificar el número de huevos infectados en el suelo, en cada unidad experimental se colocaron 10 masas de huevos de *M. incognita* depositadas entre dos telas de nylon con una abertura de malla de 60 μ m y sujetas entre dos placas plásticas (24 \times 26 mm) para diapositivas fotográficas (Gepe, Zug, Zwitterland) (Atkins *et al.*, 2003; Siddiqui *et al.*, 2009). El número promedio de huevos por masa fue de 200. A cada unidad experimental se le aplicó un tratamiento de 10 ml de extracto acuoso al 25% de concentración y finalmente 10 ml de agua destilada esterilizada para proporcionar la humedad necesaria para el desarrollo adecuado del hongo y la viabilidad de los huevos del nematodo. Las unidades experimentales fueron colocadas en bolsas transparentes (307 \times 660 mm) para autoclave (polipapel, Sterilin® Thermo Fisher, UK) para permitir la mejor conservación de humedad y se dejaron a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) en el invernadero. Al doceavo día se recogieron las masas de huevos, las cuales fueron disgregadas manualmente y colocadas en placas de agar selectivo (agar técnico, Oxoid®) 8 g/L, con los antibióticos sulfato de estreptomina (50 mg/L), cloranfenicol (50 mg/L) y clorotetraciclina (50 mg/L). Las placas con los huevos se incubaron a 25°C durante 3 días. La variable de respuesta a evaluar fue el porcentaje de parasitismo de *P. chlamydosporia* sobre los huevos de *M. incognita* en presencia de extractos vegetales acuosos con propiedades contra nematodos. Los datos no requirieron transformación al cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza. Finalmente se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y una comparación de medias (DMS, $P = 0.05$) con el programa SigmaStat 3.5.

RESULTADOS

El primer ensayo se realizó por duplicado y no se encontraron diferencias entre uno y otro ($F_{1,6} = 1.47$, $P = 0.271$). Por esta razón, se analizaron los resultados de ambos ensayos como uno solo. En este análisis se encontraron diferencias significativas en la interacción entre el extracto en crudo acuoso, el hongo y el tiempo, sin tomar en cuenta el control negativo (tratamiento al que no se aplicaron conidias ni extracto vegetal crudo) ($F_{6,105} = 5.33$, $P < 0.001$).

Al comparar todos los tratamientos entre sí, se encontraron diferencias (DMS ($P = 0.05$) = 4.205), en donde fue evidente que en los tratamientos con extracto vegetal disminuyó el porcentaje de parasitismo a menos del 50% con ambas cepas del hongo (Cuadro 1). Por otro lado, el porcentaje de parasitismo fue estadísticamente diferente a las 24 y 48 hr para algunos de los tratamientos (DMS ($P = 0.05$) = 3.742), ya que éste aumentó con el tiempo de exposición de los huevos al tratamiento.

Aunque en todos los tratamientos el parasitismo disminuyó con respecto al control, en ninguno desapareció la capacidad de parasitar. Se observó que el parasitismo del hongo es modificado por el tiempo de exposición al tratamiento, ya que hubo tratamientos como el de *R. raphanistrum*, en el que durante las primeras 24 hr el parasitismo fue reducido notoriamente, pero a las 48 hr, éste se recuperó, principalmente con la cepa Pc341 (Cuadro 1). La Pc10 fue mayormente afectada por la adición de los extractos vegetales en crudo al inhibirse en mayor proporción el porcentaje de parasitismo a las 24 hr, con una recuperación notoria a las 48 hr posteriores a la aplicación de los extractos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Medias del porcentaje de parasitismo de la cepa Pc341 y Pc10 en presencia de extractos vegetales crudos 24 y 48 horas después de su adición.

Extracto Vegetal Crudo	Porcentaje de parasitismo			
	Tiempo			
	Cepa Pc341 ^x		Cepa Pc10 ^w	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
<i>Crotalaria ochroleuca</i> ^y	2.87	6.88	2.75	5.38
<i>Datura stramonium</i> ^z	18.00	18.75	16.00	29.12
<i>Argemone mexicana</i> ^z	18.75	22.00	10.12	28.25
<i>Raphanus raphanistrum</i> ^{yz}	9.37	27.88	9.25	28.88
<i>Chenopodium album</i> ^{yz}	17.00	24.87	9.00	26.37
<i>Nerium oleander</i> ^z	22.38	21.12	24.12	33.38
Control (solo YEM) ^{yz}	77.37	86.13	76.25	88.25

(^x and ^w)DMS ($P = 0.05$) = 3.742, SED = 1.887 con grados de libertad = 105 (por efecto del tiempo para cada extracto vegetal en crudo). ^{yz}Tratamientos de la Cepa Pc341^(y) y de la Cepa Pc10^(z) con diferencias por efecto del tiempo. (^{yz}) DMS ($P = 0.05$) = 4.205, SED = 2.132 con grados de libertad = 190 (todas las comparaciones).

Respecto al porcentaje de parasitismo de *P. c.* var. *chlamydosporia* sobre huevos de *M. incognita* en presencia de los extractos vegetales acuosos en crudo, aplicados en el suelo, se encontraron diferencias significativas por efecto de la cepa ($F_{1,24} = 17.308$, $P < 0.001$); la media del porcentaje de parasitismo para ambas cepas fue diferente, siendo Pc341 la que mostró un porcentaje significativamente más alto (media Pc341 = 74.5 y Pc10 = 69.5. DMS ($P = 0.05$) = 2.480). Las diferencias más notorias fueron producidas por efecto del tratamiento de extracto vegetal ($F_{5,24} = 39.344$, $P < 0.001$) (Figura 1), los tratamientos que promovieron el mayor porcentaje de parasitismo en ambas cepas fueron *D. stramonium* y *A. mexicana* aunque todas superaron al control. No se observó una interacción de cada cepa con los extractos ($F_{5,24} = 1.318$, $P = 0.290$).

DISCUSIÓN

Los extractos vegetales pueden, entre otros factores, afectar la eclosión de los huevos de los nematodos (Bharadwaj y Sharma, 2007), y tener un efecto nematocida o nematostático contra *Meloidogyne* spp. (Franzener *et al.*, 2007; Herrera-Parra *et al.*, 2009; Mareggiani *et al.*, 2010; Vilchis-Martínez *et al.*, 2011). Al incorporar plantas o sus derivados, el aporte nutricional de éstas al medio en el que son aplicadas se modifica, afectando también las actividades del hongo, como ocurre con *P. chlamydosporia* (Kerry y

Bourne, 1996). Una muestra de ello son los resultados de Luambano-Nyoni (2009), quien encontró que al incorporar extractos de *C. ochroleuca* o de aserrín al medio nutritivo YEM se obtuvo un porcentaje de infección menor al 50% de *P. chlamydosporia* Pc10 sobre los huevos de *M. incognita*; resultados que concuerdan con lo obtenido en el presente trabajo. Estos resultados obtenidos en YEM contrastan con los obtenidos al incorporar los extractos a suelo estéril, ya que, en este caso, la actividad parasítica incrementó. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que en este ensayo las masas de huevos y el hongo estuvieron expuestos diariamente durante 12 días a los extractos vegetales aplicados al suelo, tiempo en el que el proceso natural de oxidación y descomposición del suelo y los compuestos agregados a éste siguió su curso. Los resultados obtenidos concuerdan con los descritos por Luambano-Nyoni (2009), quien reportó que a mayor descomposición de la materia orgánica añadida al medio, el porcentaje de parasitismo del hongo sobre huevos de *Meloidogyne* es mayor.

Por otra parte, el tiempo y frecuencia de aplicación de los tratamientos a base de extractos vegetales acuosos también afecta la respuesta del hospedante al nematodo. Por ejemplo, una aplicación semanal de extractos acuosos de *Tagetes* spp. durante ocho semanas al suelo o a las hojas de plantas de tomate infectadas con *M. incognita*, produjo un mejor crecimiento vegetal, reducción en el agallamiento radical y de la población

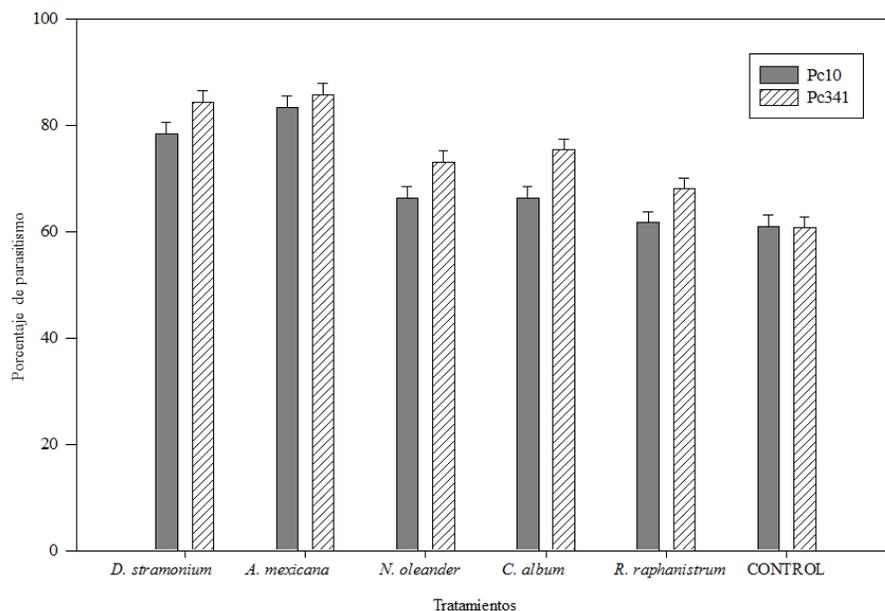


Figura 1. Porcentaje de parasitismo en los huevos de *Meloidogyne incognita* por las cepas Pc10 y Pc341 de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en suelo estéril adicionado con extractos vegetales en crudo. Extracto vegetal crudo: DMS ($P = 0.05$) = 2.480, SED = 1.472 gl = 35. Cepa: DMS ($P = 0.05$) = 0.982 SED = 0.850 gl = 35.

del nematodo en comparación con una sola aplicación del extracto; entre los posibles mecanismos de respuesta de la planta a los tratamientos y control de nematodos se ha considerado incluso a la resistencia inducida (Franzener et al., 2007). En el caso de *Pochonia*, se conoce poco acerca del efecto de la concentración, la frecuencia y el tiempo de aplicación de extractos vegetales con propiedades antinematodos tanto en el hongo como en plantas infectadas con *Meloidogyne* spp. y su efecto en la rizósfera y en otros parámetros como los estudiados por Franzener et al. (2007).

Una muestra de la viabilidad de la estrategia de incorporación de material vegetal para el control de fitopatógenos en el suelo es el trabajo de Rizvi et al. (2012), en donde observaron no sólo la disminución de los daños ocasionados por hongos y nematodos, incluido *Meloidogyne*, sino que, además, hubo un aumento en la frecuencia de hongos saprofitos como *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum* y *Trichoderma viride*, éste último también considerado un antagonista de *Meloidogyne* spp. Es importante resaltar que algunas especies de plantas del mismo género utilizadas en el estudio han sido reportadas no solo por su efecto contra nematodos (Manzanilla-López, 2004; Marahatta et al., 2012), sino también por sus propiedades contra algunos hongos fitopatógenos habitantes de suelo (Montes-Belmont et al., 2000).

Se ha demostrado también que la eficacia en el control de nematodos agalladores se puede aumentar al combinar diferentes métodos de control (Ljani et al., 2000) como son los cultivos de cobertura cuya combinación con *P. chlamydosporia* favorecen el establecimiento del hongo en el suelo y mejoran así el control de *M. javanica* (Giaretta et al., 2011).

En conclusión los resultados obtenidos muestran que es necesario continuar estudiando la posibilidad de combinar la incorporación ya sea en polvo o en forma de extracto acuoso en crudo de *A. mexicana*, *C. album*, *D. stramonium*, *R. raphanistrum*, *N. oleander* y *C. ochroleuca*, con el hongo *P. chlamydosporia* como parte de las estrategias de control del manejo integrado de *M. incognita*. Es recomendable continuar este tipo de estudios así como la identificación de los compuestos y metabolitos presentes en los extractos en crudo de las especies vegetales con propiedades antinematodos.

AGRADECIMIENTOS

Por el apoyo brindado por los Dres. John Lucas y Penny R. Hirsch y CONACYT (México) dentro del programa de beca-mixta, para la realización de una estancia especial de investigación y las facilidades para la realización de estos ensayos en Rothamsted, Research, UK. Al Dr. Angel René Arzuffi Barrera (CEPROBI, IPN) y a la Dra. Elisa Loza (Rothamsted Research) por sus valiosas sugerencias en la parte estadística. A los doctores Emma Zavaleta Mejía y Alejandro Tovar Soto por sus valiosas sugerencias en la revisión de este trabajo. Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo

brindado para la realización de la estancia.

LITERATURA CITADA

- Atkins, S. D., I. M. Clark, D. Sosnowska, P. R. Hirsch, and B. R. Kerry. 2003. Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, real time PCR, selective media, and baiting. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4788-4793.
- Bharadwaj, A., and S. Sharma. 2007. Effect of some plant extracts on the hatch of *Meloidogyne incognita* eggs. *International Journal of Botany* 3:312-316.
- Cid del Prado, I., A. Tovar Soto, y H. J. Alfonsina. 2001. Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:32-39.
- Duke, J. 2008. Phytochemical data base. Online. <http://www.ars-grin.gov/duke>.
- Esteves, I., B. Peteira, S. D. Atkins, N. Magan, and B. Kerry. 2009. Production of extracellular enzyme by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research* 113:867-876.
- Esteves, I. 2007. Factors affecting the performance of *Pochonia chlamydosporia* as biological control agent for nematodes. Ph.D. Thesis, Cranfield University, UK.
- Franzener, G., A. S. Martínez-Franzener, J. R. Stangarlin, C. Furlanetto, and K. R.F. Schwan-Estrada. 2007. Protection of tomato plants by *Tagetes patula* aqueous extract against *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira* 31:27-37.
- Giaretta, R. D., L. G. Freitas, E. A. Lopes, F. Silamar, G. S. Podesta, and E. L. Agnes, 2011. Cover crops and *Pochonia chlamydosporia* for the control of *Meloidogyne javanica*. *Nematology* 13:919-926.
- Hernández, M.A., and L. Hidalgo-Díaz. 2008. KlamiC: Bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. *Revista de Protección Vegetal* 23:131-134.
- Herrera-Parra, E., J. Cristóbal-Alejo, J. M. Tún-Suárez, M. M. Gamboa-Angulo, and N. Marbán-Mendoza. 2009. Water extracts of *Calea urticifolia* Mill. for the control of *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 39:289-296.
- Kerry, B. R., and J. M. Bourne. 1996. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pest Science* 47:69-75.
- Kerry, B. R. 1995. Ecological considerations for the use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Canadian Journal of Botany* 73:565-570.
- Kokalis-Burelle, N., and R. Rodríguez-Kábana. 2006. Allelochemicals as biopesticides for management of plant parasitic nematodes. Pp. 15-30 in: I. Mukerji and K. G. Mukerji, eds. *Allelochemicals:*

- biological control of plant pathogens. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Ljani, A. S. M., R. B. Mabagala, and S. Nchimbi-msolla. 2000. Efficacy of different control methods applied separately and in combination in managing root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in common beans. *European Journal of Plant Pathology* 106:1-10.
- Luambano-Nyoni, N. 2009. Potential of biocontrol agents and compatible cultural practices for root-knot nematode management in tomato. Thesis Doctor of Philosophy in Plant Nematology Department of Plant Science and Crop Protection, Faculty of Agriculture University of Nairobi, pp. 113-124.
- Mansour, S. 2004. Pesticide exposure-Egyptian scene. *Toxicology* 198:91-115.
- Manzanilla-López, R. H. 2004. Nematode management in subsistence farming systems in Mexico. *Nematology Monographs and Perspectives* 2:97-108.
- Manzanilla-López, R. H., I. Esteves, M. M. Finetti-Sialer, P. R. Hirsch, E., Ward, J. Devonshire, and L. Hidalgo-Díaz. 2013. *Pochonia chlamydosporia*: advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endoparasitic nematodes. *Journal of Nematology* 45:1-7.
- Marahatta, S. P., K. H. Wang, B. S. Sipes and R. R. Hooks. 2012. Effects of *Crotalaria juncea* on the anhydrobiotic state of *Rotylenchulus reniformis*. *Nematropica* 42:34-40.
- Mareggiani, G., N. Zamuner, y G. Angarola. 2010. Efecto de extractos acuosos de dos meliáceas sobre *Meloidogyne incognita* (Nematoda, Meloidogynidae). *Revista Latinoamericana de Química* 38:68-73.
- Moens, M., R. N. Perry, and J. L. Starr. 2009. *Meloidogyne* species- a diverse group of novel and important plant parasites. Pp. 8-9 in R. N. Perry, M. Moens and J. L. Starr, eds. *Root-Knot Nematodes*. Wellingford, UK: CAB International.
- Montes-Belmont, R. 2000. *Nematología vegetal en México, Investigación documental*. Segunda edición, 98 pp. México: Sociedad Mexicana de Fitopatología.
- Montes-Belmont, R., and H. E. Flores-Moctezuma. 2011. La alelopatía como base científica para el manejo de nematodos fitoparásitos. Pp. 167-182 in C. Rodríguez-Hernández, J.F. López-Olguín, y A. Aragón-García, eds. Montecillo, México. Alternativas ecológicas contra plagas. Agricultura sostenible 7: Colegio de Postgraduados y Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Montes-Belmont, R., V. Cruz-Cruz, G. Martínez-Martínez, G. Sandoval-García, R. García-Licona, S. Zilch-Domínguez, L. Bravo-Luna, K. Bermúdez-Torres, H.E. Flores-Moctezuma, y M. Carvajal-Moreno, 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18:125-131.
- Siddiqui, A., S. D. Atkins, and B. R. Kerry. 2009. Relationship between saprophytic growth in soil of different biotypes of *Pochonia chlamydosporia* and the infection of nematode eggs. *Annals of Applied Biology* 155:131-141.
- St. Leger, R. J., T. M. Butt, M. S. Goettel, R. C. Staples, and D. W. Roberts. 1989. Production *in vitro* of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* 13:274-288.
- Rizvi, R., I. Mahmood, S. A. Tiyagi, and Z. Khan. 2012. Effect of some botanicals for the management of plant-parasitic nematodes and soil-inhabiting fungi infesting chickpea. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 36:710-719.
- Vilchis-Martínez, K., R. Montes-Belmont, R. H. Manzanilla-López, and H. E. Flores-Moctezuma. 2011. Manejo de *Meloidogyne incognita* incorporando *Pochonia chlamydosporia* y plantas con propiedades contra nematodos. Libro electrónico: Agricultura sostenible vol. 7 CD-ROM Pp. 112-123.
- Ward, E., B. Kerry, R. Manzanilla-López, G. Mutua, J. Devonshire, and P. Hirsch. 2012. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene *vcpl* is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode biocontrol. *PLoS ONE* 7(4):e35657.

Received:

7/VIII/2013

Accepted for publication:

13/XI/2013

Recibido:

Aceptado para publicación: