



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

Casa abierta al tiempo

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTIVIDAD NEMATOSTÁTICA DE EXTRACTOS LIOFILIZADOS DE
CULTIVO DE *Metarhizium anisopliae* SOBRE *Nacobbus aberrans*

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Agropecuarias

P R E S E N T A

MÓNICA YAZMÍN LÓPEZ SÁNCHEZ

Ciudad de México, 17 de Mayo de 2017

Comité Tutorial:

Director: Dr. Antonio Flores Macías
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal

Co-Director: Dr. Esteban Barranco Florido
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos

Asesor: M. en C. Daniel Ruíz Juárez
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal

La presente tesis titulada Actividad nematostática de extractos liofilizados de cultivo de *Metarhizium anisopliae* sobre *Nacobbus aberrans* realizada por la alumna Mónica Yazmín López Sánchez ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias Agropecuarias

Sinodales

Director

Rodolfo Figueroa Brito

Secretario

David Montiel Salero

Vocal

Daniel Ruiz Juarez

Ciudad de México, 17 de mayo de 2017

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por el impulso a la ciencia y tecnología en México, particularmente por el apoyo en el desarrollo de éste trabajo a través de la beca 641652.

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco por la infraestructura y los recursos humanos para mi formación.

Al Doctor Antonio Flores Macías por formar parte en mi proceso de formación y por mostrarme cómo funcionan algunas cosas en la vida.

Al Doctor Juan Esteban Barranco Florido mi infinito agradecimiento por aceptar ser parte del comité a pesar de los contratiempos, por su constante apoyo y sobre todo por su calidad humana.

Al M. en C. Daniel Ruíz Juárez por sus aportaciones y atención al trabajo realizado, por no dejar que me rindiera nunca, por ampliar mi panorama, por su amistad...

Al Dr. Octavio Loera Corral por las facilidades para la obtención de dos cepas pertenecientes a la colección de hongos entomopatógenos del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Al Dr. David Montiel Salero por el espacio en el laboratorio de Fitopatología, así como la orientación y enseñanza en técnicas y manejo de nematodos.

Al M. en C. Juventino Cuevas Ojeda que a pesar de su apretado itinerario me brindó tiempo y conocimiento de calidad.

Al M. en C. Calixto Carillo Fonseca por brindarme conocimiento para el manejo de nematodos, por ayudarme a conseguir al nematodo, por sus conversaciones y sobre todo por la calidad de persona y entrega a la labor docente.

A mis compañeros de laboratorio de Biotecnología: Víctor, Rodrigo y Carlitos por hacer del laboratorio un lugar agradable.

A mis compañeras del laboratorio de Preparaciones: Alex y Rosita y Marú que me facilitaron y ayudaron a conseguir reactivos, equipo, material...

A Mónica Gutiérrez Rojas por escucharme, apoyarme, por ser un equipo extraordinario para el trabajo, pero sobre todo para la vida...estoy infinitamente agradecida.

A mi madre Ofelia Sánchez Ortiz por jamás tomar en cuenta todos descuidos que tuve hacia su persona en este proceso.

A Nelson Martínez Rodríguez por estar conmigo y apoyarme en todo el proceso de maestría y de la vida.

DEDICATORIAS

A la perseverancia, al tiempo, a la vida....

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE CUADROS	4
RESUMEN	5
I. INTRODUCCIÓN	6
II. REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1 Importancia agrícola y económica de los nematodos fitopatógenos.....	7
2.2 Importancia agrícola y económica de <i>N. aberrans</i>	9
2.3 Distribución geográfica.....	10
2.4 Ciclo de vida	11
2.5 Métodos de control.....	12
2.5.1 Control físico	12
2.5.2 Control químico.....	13
2.5.3 Control legal	13
2.5.4 Control genético.....	15
2.5.5 Control biológico	16
2.6 Hongos productores de metabolitos nematotóxicos	19
2.6.1 Hongos endófitos	21
2.6.2 Metabolitos secundarios obtenidos de <i>Metarhizium</i> spp.....	22
III PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
IV HIPÓTESIS	24
V OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos particulares	24
VI METODOLOGÍA	25
6.1 Evaluación del crecimiento de tres cepas de <i>M. anisopliae</i>	25
6.1.1 Activación de cepas.....	25
6.1.2 Obtención de aislados monospóricos.....	25
6.1.3 Producción de conidios.....	26
6.1.4 Viabilidad de esporas	26
6.1.5 Crecimiento radial	26
6.1.6 Determinación de biomasa por peso seco	27

6.1.7. Determinación de la densidad superficial.....	27
6.2 Obtención de sobrenadante liofilizado	27
6.2.1 Medio de cultivo	27
6.2.2 Condiciones de fermentación	28
6.2.3 Obtención del extracto liofilizados.....	28
6.3 Condiciones de reproducción de <i>Nacobbus aberrans</i>	28
6.3.1 Origen e identificación de <i>Nacobbus aberrans</i>	28
6.3.2 Incremento de la población	29
6.3.3 Obtención de nematodos J2	29
6.4 Efecto tóxico del extracto liofilizado de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>N. aberrans</i>	30
6.5 Diseño experimental y análisis de datos	30
VII RESULTADOS	31
7.1 Evaluación del crecimiento de tres cepas de <i>M. anisopliae</i>	31
7.1.1 Activación de cepas	31
7.1.2 Cultivos monospóricos	32
7.1.3 Producción de conidios	33
7.1.4 Viabilidad	34
7.1.5 Velocidad de crecimiento.....	34
7.1.6 Biomasa por peso seco	35
7.1.7 Densidad superficial	36
7.1.8 Cuantificación de péptidos	37
7.2 Condiciones de reproducción de <i>Nacobbus aberrans</i>	38
7.3 Efecto tóxico del extracto liofilizado de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>N. aberrans</i>	39
VIII DISCUSIÓN	40
8.1 Producción de conidios y viabilidad de tres cepas de <i>M. anisopliae</i>	40
8.2 Crecimiento, biomasa y producción de péptidos en el medio AG	41
8.3 Extractos liofilizados de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>N. aberrans</i>	42
IX. CONCLUSIONES	44
X. LITERATURA CITADA.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lugares reportados con presencia de <i>N. aberrans</i> en América y México.....	10
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Nacobbus aberrans</i>	12
Figura 3. Crecimiento plurispórico de <i>Metarhizium anisopliae</i> a los once días en medio SDA.	31
Figura 4. Crecimiento monospórico de <i>M. anisopliae</i> A) Crecimiento de la cepa <i>Uam-X</i> en cuatro diluciones consecutivas 1:10, 1:100, 1:1000, 1:100000; B) siembra del cultivo monospórico.....	32
Figura 5. Crecimiento de cultivo monospórico de tres cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> en medio PDA A) <i>Uam-X</i> , B) <i>Xoch-8</i> , C) <i>Tac-1</i>	33
Figura 6. Porcentaje de viabilidad de tres cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i>	34
Figura 7. Crecimiento radial diario de las tres cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Tac-1</i> , <i>Xoch-8</i> y <i>Uam-X</i> (promedio de tres repeticiones).	35
Figura 8. Peso acumulado de la biomasa de <i>Metarhizium anisopliae</i> en fermentación líquida con medio AG.....	36
Figura 9. Producción de biomasa de <i>M. anisopliae</i> cepa <i>Xoch-8</i> en fermentación líquida con medio AG.	36
Figura 10. Comparación de la densidad superficial de tres cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> en medio AG.	37
Figura 11. Raíces de <i>Solannum lycopersicum</i> con presencia de agalladas: a) y b) raíces de <i>S. lycopersicum</i> variedad Moctezuma con agallas causadas por <i>Nacobbus aberrans</i> y c) Índice de agallamiento con valor 4 Tomado y modificado de Coyne, 2007.	38
Figura 12. Promedio de inmovilidad en J2 de <i>Nacobbus aberrans</i> como respuesta a tres tiempos de exposición (24, 48 y 72 h) a extractos liofilizados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	39

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje de pérdidas de rendimiento causadas por nematodos fitoparásitos	8
Cuadro 2. Cultivos en cuarentena para México por la presencia de nematodos de importancia cuarentenaria.....	14
Cuadro 3. Municipios y estados con cuarentena para <i>Globodera rostochiensis</i> y <i>Meloidogyne chitwoodi</i> en México	15
Cuadro 4. Ingredientes activos utilizados para el control de nematodos	17
Cuadro 5. Estudios realizados con extractos y compuestos de hongos con actividad nematocida y nematostática	20
Cuadro 6. Características del crecimiento plurispórico de tres cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> en medio Sabouraud.....	31
Cuadro 7. Características del crecimiento del cultivo monospórico de tres cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> en medio PDA	33
Cuadro 8. Rendimiento de conidios de cepas monospóricas y plurispóricas de <i>Metarhizium anisopliae</i>	34
Cuadro 9. Velocidad de crecimiento radial de tres cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> en caja Petri con medio de cultivo harina de avena.....	35
Cuadro 10. Producción de péptidos de tres cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> en fermentación líquida con medio AG	38
Cuadro 11. Evaluación de tres cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i>	41

RESUMEN

Nacobbus aberrans es un nematodo de importancia y económica a nivel internacional. Como respuesta a las actuales restricciones en el uso de nematicidas químicos, se necesita generar nuevos productos para el control de nematodos. Los hongos entomopatógenos son una fuente de nuevas moléculas con actividad nematicida y nematostática. Los depsipéptidos que generan estos hongos muestran actividad biológica y efecto insecticida en diferentes especies de insectos plaga, por lo que se consideran como agentes de control, sin embargo son pocos los estudios realizados con *N. aberrans*. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto nematostática de extractos liofilizados obtenidos de tres cepas de *Metarhizium anisopliae*, sobre *N. aberrans* en condiciones de laboratorio. Se emplearon tres cepas de *M. anisopliae* *Uam-X*, *Tac-1* y *Xoch-8* que se crecieron en medio harina de avena al 1.5%, glucosa 0.5% durante siete días. Posteriormente, el extracto se obtuvo por centrifugación y filtración, posteriormente se liofilizó. Se determinaron los parámetros de producción de conidios, viabilidad, crecimiento radial, densidad superficial y concentración de péptidos, donde la cepa *Uam-X* obtuvo la mayor producción de conidios (2.3×10^7), las tres cepas presentaron la misma viabilidad (95-97%) y crecimiento radial (0.205-0.249 cm), la cepa *Xoch-8* presentó mayor densidad superficial (17.39 mg/cm²) y la cepa *Tac-1* tuvo la mayor concentración de péptidos (0.1321 mg mL⁻¹). Para evaluar la capacidad nematostática de los extractos de las tres cepas de *M. anisopliae*, se agregaron 600 ppm de cada liofilizado en 10 mL de agua destilada estéril; cada liofilizado se constituyó en un tratamiento además del testigo (agua destilada estéril), con cuatro repeticiones por tratamiento (16 unidades experimentales). En cada tratamiento se colocaron 40 individuos de *N. aberrans* en el estadio J2, en condiciones de oscuridad a 25°C. A las 24, 48 y 72 horas se contabilizó la inmovilidad de los individuos J2, se utilizó un microscopio estereoscópico. Los datos fueron analizados mediante un diseño mixto con medidas repetidas en el tiempo (JMP versión 8).

La cepa *Xoch-8* presentó mayor efecto nematostático respecto de *Uam-X* y *Tac-1*, los extractos de naturaleza proteica obtenidos de *M. anisopliae* tuvieron un efecto biológico sobre los J2 de *N. aberrans* disminuyendo su movilidad.

I. INTRODUCCIÓN

Nacobbus aberrans ocasiona pérdidas en el rendimiento de cultivos de importancia económica, éste patógeno de plantas tiene la capacidad de parasitar una amplia gama de hospederos; su alta capacidad reproductiva y facultad para establecerse en diferentes condiciones medioambientales obligan a los países libres del nematodo a generar normas fitosanitarias para evitar su entrada (Manzanilla-Lopez *et al.*, 2002). Por lo anterior, es considerado como uno de los diez nematodos de importancia fitopatológica a nivel internacional (Jones *et al.*, 2013). *N. aberrans* se caracteriza por deformar y disminuir el desarrollo radicular, forman agallas ó nódulos que inducen a la formación de hinchamientos en las raíces, las cuales limitan el flujo de nutrientes, lo que tiene como consecuencia la disminución en el rendimiento de los cultivos afectados (Franco *et al.*, 1999).

En México, *N. aberrans* ha ocasionado pérdidas hasta del 55% en el cultivo de tomate y 36% en el cultivo de frijol (Manzanilla-López *et al.*, 2002); en el Estado de Michoacán se encuentra afectando cultivos hortícolas comerciales con índices de agallamiento del 10 al 100% (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2015).

Las alternativas para controlar las especies de nematodos del género *Nacobbus* se realizan mediante la aplicación de prácticas culturales, control biológico, físico, legal, genético y principalmente el químico. Del 2001 al 2009 el consumo de ingredientes activos utilizados para agroquímicos en México aumentó en un 100% (FAOSTAT, 2014). El uso de plaguicidas ha ocasionado daños al medio ambiente ya que es una de las principales fuentes de contaminación del agua dulce con compuestos carcinógenos y tóxicos (FAO, 2002); además, el uso incorrecto de los productos causa residualidad en suelos y toxicidad en alimentos.

Por a lo anterior, se han generado restricciones en el uso de los nematocidas químicos, como carbamatos y organofosforados, ingredientes utilizados como nematocidas. Estas restricciones conducen a la necesidad de generar alternativas de control para nematodos parásitos de plantas, mediante el uso de otros organismos o la generación de nuevas moléculas nematocidas con menor impacto negativo al ambiente. Actualmente, el control biológico ha recibido un mayor impulso en el sector industrial, comercial y académico (Davies y Spiegel, 2011). Dentro de los organismos utilizados de forma comercial para el control de nematodos se encuentra el uso de conidios de los hongos *Paecilomyces lilacinus*, *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. (DIPO, 2012). Por otro lado, se han encontrado moléculas de diferentes hongos con actividad nematostática y nematocida (Li y Zhang, 2014); sin embargo, son pocos los estudios realizados con *N. aberrans* (Flores-Camacho *et al.*, 2008).

También *Metarhizium anisopliae* es uno de los hongos entomopatógenos utilizados para reducir poblaciones de insectos (Sun *et al.*, 2002). Se ha encontrado que los metabolitos producidos por éste hongo son tóxicos a un amplio rango de animales (Gupta *et al.*, 1993; Roberts y Leger, 2004; Carollo *et al.*, 2010) hongos, bacterias y virus (Krasnoff *et al.*, 2006).

Con base en lo anterior, el presente trabajo abordará el estudio de la actividad nematostática de extractos liofilizados de cultivo de *M. anisopliae* obtenido por fermentación líquida, sobre *N. aberrans* en condiciones de laboratorio.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia agrícola y económica de los nematodos fitopatógenos

La importancia de los nematodos parásitos de plantas radica en la capacidad de afectar una gran variedad de cultivos agrícolas de importancia económica (Putten y Stoel, 1998; Siddiqui *et al.*, 2014), y en la disminución en el rendimiento de los cultivos afectados.

A nivel mundial se estima que los daños causados por nematodos en las plantas ascienden a 80 mil millones de dólares por año (Nicol *et al.*, 2011); aunque sólo es una estimación, debido a que muchos países en desarrollo no cuantifican correctamente o no perciben los daños causados por nematodos. Además, las pérdidas en la producción agrícola varían de un ciclo a otro, tiempo en el que influyen las variedades del cultivo, las condiciones climáticas y los factores bióticos del suelo (Chen *et al.*, 2011). En algunos casos las pérdidas pueden ser del 20%; sin embargo, en cultivos básicos que son de autoconsumo, las pérdidas son mayores, incluso llegan a sobrepasar el umbral económico (Lilley *et al.*, 2011). En diferentes zonas productoras del mundo los nematodos fitoparásitos ocasionan una disminución en la producción de alimentos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de pérdidas de rendimiento causadas por nematodos fitoparásitos

País	Cultivo	Pérdida (%)	Nematodo	Fuente
E.U.(Minnesota)	Soya	30	<i>Heterodea glycines</i>	Chen <i>et al.</i> , 2011
Australia (Victoria)	Cereales	44	<i>Pratylenchus neglectus</i>	Vanstone <i>et al.</i> , 2008
México	Tomate	55	<i>Nacobbus aberrans</i>	Manzanilla-Lopez <i>et al.</i> , 2002
México	Frijol	36	<i>Nacobbus aberrans</i>	Manzanilla-Lopez <i>et al.</i> , 2002

En Estados Unidos las pérdidas anuales en las cosechas ocasionadas por nematodos se estiman hasta por dos mil millones de dólares; para su control se invierten hasta 60 millones de dólares anuales en el uso de nematicidas (Cano *et al.*, 2004).

Los nematodos tienen la capacidad de diseminarse fácilmente en campo como resultado del manejo realizado por los productores mediante el uso de herramientas, embalajes, suelo, o productos que se desplazan de un cultivo parasitado a uno libre de nematodos fitopatógenos. Cuando no se realiza un control adecuado, estos organismos pueden distribuirse para infectar diferentes zonas productoras a través de los años (Chen *et al.*, 2011). La posibilidad de que una planta sea parasitada por nematodos se potencializa ya que existen más de

4,100 especies de nematodos patógenos de plantas (Jones *et al.*, 2013). Se sabe que el daño ocasionado por fitonemátodos en una planta puede llegar a 75%, causando una fuerte pérdida en los sistemas de producción de éste cultivo (Montes, 2000; Velásquez-Valle *et al.*, 2006).

Considerando lo anterior, el manejo y control de los nematodos parásitos de plantas es esencial para mantener una producción económicamente rentable de los cultivos en los sistemas agrícolas intensivos y para garantizar la seguridad alimentaria de los agricultores de subsistencia o de escasos recursos (Lilley *et al.*, 2011, Siddiqui *et al.*, 2014).

2.2 Importancia agrícola y económica de *N. aberrans*

N. aberrans es considerado como uno de los 10 nematodos más importantes a nivel internacional (Jones *et al.*, 2013), las características por las que se le atribuye la importancia son: su alta capacidad reproductiva, un amplio rango de hospederos y las restricciones cuarentenarias que se le aplican (Manzanilla-Lopez *et al.*, 2002). En Estados Unidos de América, *N. aberrans* se encuentra entre las principales especies de fitonemátodos que ocasionan pérdidas en el cultivo de remolacha (Inserra *et al.*, 1984). En el estado de Puebla, México se reportaron pérdidas en los cultivos de frijol de 18 a 36% y en tomate de 50 a 60% (Silva, 1989; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). Así mismo, las pérdidas estimadas ocasionadas en tomate para Tecamachalco, Puebla son del 50 al 70% (Cid del Prado *et al.*, 1997). En 2002 se reportaron pérdidas hasta del 55% en el cultivo de tomate y 36% en el cultivo de frijol (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Michoacán obtuvo cultivos hortícolas comerciales con índices de agallamiento del 10 al 100% (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2015). De la amplia gama de plantas hospederas de *N. aberrans* destaca por su importancia económica el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y remolacha (*Beta vulgaris* L.) (Toledo *et al.*, 1993).

2.3 Distribución geográfica

N. aberrans es asociado a numerosos cultivos y plantas nativas en áreas templadas y subtropicales de América del Norte y Sud-América (Figura 1); su distribución va del nivel del mar hasta los 4000 msnm (Hernández-Ochandia *et al.*, 2012). En los Estados Unidos se le ha localizado en los estados del Centro y Noreste, específicamente en Arkansas, Colorado, Kansas, Montana, Nebraska, Sur de Dakota, Utah y Wyoming (Robbins, 1982). En países del oeste de Sur América se encuentra principalmente en Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y Argentina, siendo una de las principales plagas en el cultivo de papa y remolacha (Manzanilla-López *et al* 2002).

En México, *N. aberrans* se localiza en los estados de Puebla, Hidalgo, México, Oaxaca, Guanajuato, Morelos (Toledo *et al.*, 1993), Zacatecas (Franco *et al.*, 2012), Michoacán (Cabrera *et al.*, 2015), San Luis Potosí y Aguascalientes (Valle, 2001).

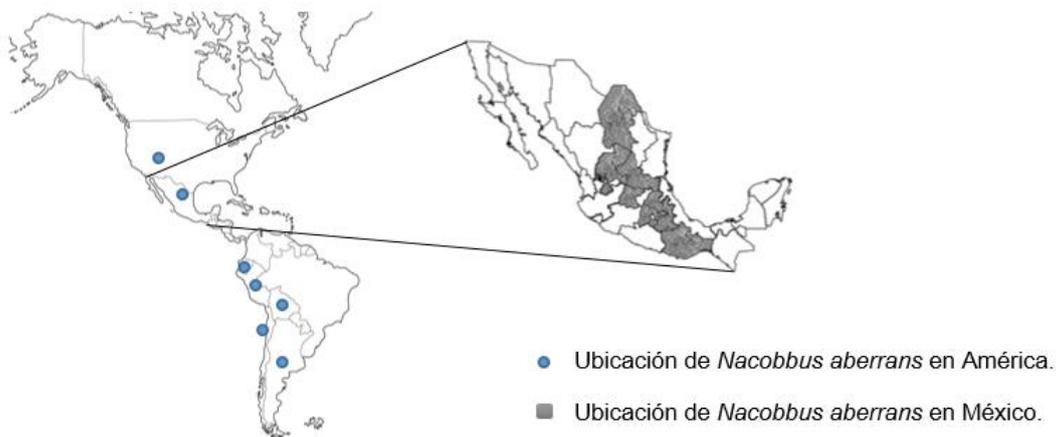


Figura 1. Lugares reportados con presencia de *N. aberrans* en América y México. Elaboración propia (2016).

2.4 Ciclo de vida

N. aberrans pasa parte de su vida en el sistema radicular de las plantas. Su ciclo de vida inicia cuando las hembras secretan una matriz gelatinosa y ponen los huevos en la matriz gelatinosa. Dentro del huevo se completa su desarrollo embrionario y el primer estadio juvenil (J1) muda dentro del huevo y eclosiona como segundo estadio juvenil (J2), el cual puede penetrar en la raíz, salir y reinfectar otras raíces. El J2 muda en la raíz al tercer estadio juvenil (J3), el cual es menos activo y se localiza frecuentemente enrollado en la corteza de la raíz. La muda del cuarto estadio juvenil femenino (J4) ocurre en la corteza, después de este estado las hembras inmaduras vermiformes se establecen cerca del cilindro vascular induciendo la formación de agallas radicales, dentro de las cuales se localizan las hembras endoparásitas sedentarias que producen los huevos y los depositan hacia la superficie de la raíz. Los machos migran en la raíz para localizar a las hembras y fertilizarlas (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

Los estadios juveniles J3, J4 y hembras jóvenes son los estadios infectivos de este nematodo. Los estadios juveniles atacan raíces y generalmente inducen pequeñas agallas (Cristóbal *et al.*, 2001). Después de la penetración en la raíz se puede observar la presencia de necrosis en el tejido cortical. Los nematodos mudan, pudiendo o no atravesar por un periodo de quiescencia (Figura 2). Esto depende del hospedante y de la temperatura. Una vez que las hembras inmaduras se forman, pueden salir del tejido radicular, atacar raíces adyacentes o migrar dentro del tejido radicular y establecerse, causando agallas radiculares.

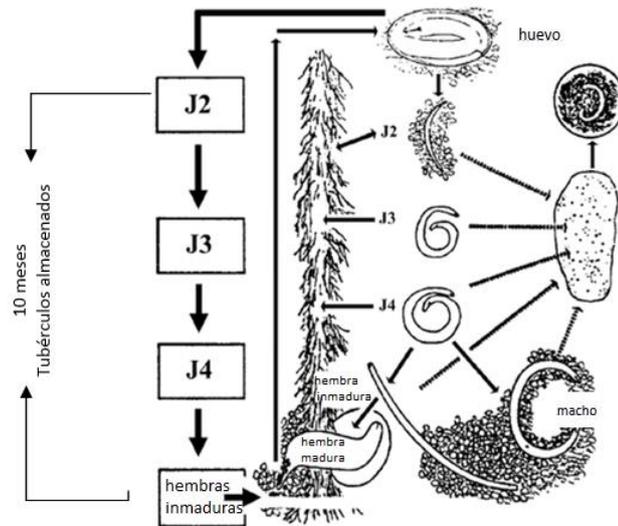


Figura 2. Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans* (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

El manejo de *N. aberrans* es insatisfactorio, esto se debe a la falta de información relacionada con su ciclo biológico, sus estadios de sobrevivencia en el suelo y los métodos de diagnóstico rápidos y confiables para su detección en muestras de suelo (Cristóbal *et al.*, 2001). Al parecer, esto limita en mayor medida su control, ya que éste patógeno puede encontrarse en el suelo en un estado de reposo llamado criptobiosis (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

2.5 Métodos de control

El control de las especies del género *Nacobbus* se realiza principalmente por prácticas de manejo integrado de los nematodos fitopatógenos, en donde destaca el control cultural, control físico, químico, legal, genético y biológico.

2.5.1 Control físico

El control físico se refiere a la introducción de un agente físico como la temperatura, humedad o radiación solar, que resulten letales para los nematodos. Entre las prácticas de éste tipo de control se encuentra la vaporización (introducción de vapor de agua en el suelo bajo cubierta plástica), la solarización (voltar el suelo húmedo hacia la superficie y cubrirlo con plástico transparente para secarlo al sol) y la inundación del suelo (Cepeda, 1996).

La incorporación de materia orgánica al suelo, provee de nutrimentos disponibles a las plantas e incrementa la actividad microbiana del suelo; además, puede ayudar a controlar poblaciones de nematodos fitopatógenos. En un experimento realizado por Villa-Briones (2008), la aplicación de vermicomposta y estiércol redujo significativamente la formación de agallas por *N. aberrans* en cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*). En otro experimento realizado con plantas de tomate, se probó el efecto de la incorporación de residuos de col e higuierilla en plantas en diferentes concentraciones y días de aplicación; uno de los resultados fue la reducción de un 46% y 54% en el porcentaje de agallamiento por *N. aberrans* al aplicar, al momento de trasplante, un 2% de residuos de col e higuierilla, respectivamente. Sin embargo, la aplicación de materia orgánica diez días antes del trasplante tuvo efecto fitotóxico para algunas plantas (Franco *et al.*, 1999).

2.5.2 Control químico

En México el uso de agroquímicos para el control de nematodos es el más común. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) hasta octubre de 2014 registró una lista de 113 empresas productoras e importadoras de plaguicidas de uso agrícola, de las cuales sólo nueve de ellas se dedican a la compra venta de nematicidas orgánicos o biológicos (SENASICA, 2014); esto, se debe a que el control con químicos sintéticos es más fácil y el que ofrece resultados relativamente rápidos y precisos; sin embargo, su uso irracional ha generado problemas en la salud humana, en el ambiente y ha creado en las especies de nematodos resistencia a los nematostáticos sintéticos; por lo que una alternativa al uso creciente de agroquímicos, es el uso de productos orgánicos o biológicos (FAOSTAT, 2014).

2.5.3 Control legal

En México, la SAGARPA ejerce un control sanitario en nematodos a través de la elaboración de Normas Oficiales Mexicanas (NOM) por medio de las que aplica cuarentena a diferentes cultivos y plagas reguladas. Los nematodos de importancia cuarentenaria son reconocidos o potencialmente peligrosos para un

país o área en la cual no están presentes y, si lo están, no se encuentran distribuidos o se encuentra bajo control oficial. Actualmente, se tiene restringido el acceso al país de cultivos que tienen nematodos de importancia cuarentenaria (Cuadro 2). En el interior de la República Mexicana el nematodo dorado (*Globodera rostochiensis*) y el nematodo agallagor (*Meloidogyne chitwoodi*) en el cultivo de papa están confinados a ciertos municipios, mismos que se encuentran bajo control fitosanitario bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-040-FITO-2002 (Cuadro 3).

Cuadro 2. Cultivos en cuarentena para México por la presencia de nematodos de importancia cuarentenaria

Cultivo	Nombre del nematodo	Norma Oficial Mexicana
Algodón	<i>Tylenchorhynchus claytoni</i>	NOM-014-FITO-1996
Plátano	<i>Radopholus similis</i>	NOM-010-FITO-1995
Cítricos (géneros <i>Citrus</i> , <i>Fortunela</i> y <i>Poncirus</i>)	<i>Radopholus similis</i> , <i>Xiphinema index</i>	NOM-011-FITO-1995
Arroz	<i>Aphelenchoides besseyi</i> , <i>Ditylenchus angustus</i> y <i>Heterodera oryzae</i>	NOM-013-FITO- 1995
Trigo	<i>Anguina tritici</i>	NOM-017-FITO-1995
Maíz	<i>Heterodera zea</i>	NOM-018-FITO-1995

Fuente: Tomado y modificado a partir de Normas Oficiales Mexicanas.

En el grupo de nematodos patógenos de plantas de América del Sur se encuentra *Nacobbus aberrans*, un formador de quistes en los tubérculos de papa; para éste nematodo, al menos 40 países han aplicado medidas de cuarentena para prevenir su introducción y diseminación (Manzanilla-López *et al.*, 2002). En Europa se considera que las poblaciones de nematodos formadores de quistes en el tubérculo de la papa son un riesgo fitosanitario, principalmente desde América del Sur, por ésta razón se fortalece el uso de la legislación fitosanitaria para evitar su introducción y diseminación en el país (Hockland *et al.*, 2012).

Cuadro 3. Municipios y Estados con cuarentena para *Globodera rostochiensis* y *Meloidogyne chitwoodi* en México

Nematodo	Estado	Municipio
<i>G. rostochiensis</i>	Guanajuato	León, San Francisco del Rincón, Silao, Romita y Purísima del Rincón.
<i>G. rostochiensis</i>	Nuevo León	Galeana
<i>G. rostochiensis</i>	Coahuila	Arteaga y Saltillo
<i>G. rostochiensis</i>	Distrito Federal	Delegación de Tlalpan y Milpa Alta
<i>G. rostochiensis</i>	Hidalgo	Metztitlán y Almoloya
<i>G. rostochiensis</i>	Tlaxcala	Cuapiaxtla, Altzayanca, El Carmen Tequexquita, Huamatla, Terrenate, Tlaxco y Chiautempan.
<i>G. rostochiensis</i>	Puebla	Aquixtla, Ixtacamaxtitlán, La fraguada, Guadalupe Victoria, Atzitzintla, Tehuacán, Chalchicomula de Sesma, Huitziahn de Serdán, Quimixtlán y Tlachichuca.
<i>G. rostochiensis</i>	Veracruz	Perote, Ayahualulco, Altotonga, Coscomatepec y Xico.
<i>G. rostochiensis</i>	Estado de México	Zinacantepec, Temascaltepec, Calimaya, San Antonio la Isla, Rayón, Amanalco, Morelos, Naucalpan de Juárez, Donato Guerra, Lerma, San Felipe del Progreso, Valle de Bravo y Metepec.
<i>M. chitwoodi</i>	Tlaxcala	Huamantla, Altzayanca, Cuapiaxtla y el Carmen Tequexquitla.
<i>M. chitwoodi</i>	Puebla	Guadalupe Victoria

Fuente: NOM-040-FITO-2002

2.5.4 Control genético

Una de las alternativas para el manejo fitosanitario de nematodos, es el uso de material vegetal de origen agrícola tolerante a la acción patogénica de nematodos fitopatógenos. En el caso de frijol, existen variedades mejoradas con diferente grado de susceptibilidad a *N. aberrans*. La variedad tolerante Flor de Mayo “M-38” es tolerante al ataque de *N. aberrans* y la variedad “Bayo Mecentral” es resistente (Franco *et al.*, 2012). En el caso de 60 variedades de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se desarrolló un estudio para determinar la resistencia a *N. aberrans* y se encontró a las variedades Cómala 1-11-4-1 y 1-24-3-1 como materiales altamente susceptibles a *N. aberrans*, en comparación con las variedades Campbell 34, 1-29-3-1 y Napoli VF con ciertos niveles de tolerancia a ésta especie (Zamudio, 1987).

2.5.5 Control biológico

El campo del control biológico de nematodos se encuentra en desarrollo, la relación entre nematodos y hongos que los infectan es objeto de diferentes estudios, los hongos antagonistas y parásitos de nematodos se conocen como nematófagos y endófitos. Los nematófagos son un grupo diverso de hongos que colonizan y parasitan nematodos para su alimentación, algunos son parásitos obligados de nematodos, sin embargo, la mayoría son saprofitos facultativos (Hallmann *et al.*, 1999). En este sentido constantes investigaciones se enmarcan en el objetivo de encontrar alternativas biológicas, que limiten la proliferación de nematodos fitopatógenos, es así como se estudian a diferentes hongos nematofagos como posibles agentes de control biológico, entre ellos se encuentra *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* quien mostró resultados positivos en aislamiento *in vitro* e *in vivo* contra huevos de *Meloidogyne javanica*, donde se observó un porcentaje de parasitación de huevos de 85 y 40, respectivamente (Ebadi *et al.*, 2009). En contraparte, diferentes estudios muestran que la eficiencia de los agentes de control reportadas en campo, son menores que las reportadas en laboratorio (Tian *et al.*, 2014; Ebadi *et al.*, 2009), lo anterior se debe a que los organismos dependen de las condiciones del suelo para mejorar la eficiencia de control biológico (Luambano *et al.*, 2015), y al lento crecimiento que presentan los hongos nematófagos en el suelo. Por lo anterior, para tener una mayor efectividad biológica de parasitismo hongo-nematodo, en campo la aplicación de un mayor porcentaje de hongos nematófagos debe ser necesario (Tian *et al.*, 2014).

En la actualidad de forma comercial el desarrollo de cepas de hongos para el control biológico de nematodos se reduce al uso de las especies *Paecilomyces lilacinus*, *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. (Cuadro 4);

Cuadro 4. Ingredientes activos utilizados para el control de nematodos

Empresa	Nombre comercial de nematocida	Sustancias activas	Clasificación
Distribuciones IMEX S.A. de C.V.	NEOTEC SO	Aceite de sésamo	Agrícola
Agroquímicos Versa S.A. de C.V.	Chimal	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Biológico
Innovak Global	Nemaroot	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Biológico
Plant Health Care De México, S. de R.L. de C.V.	Phc Lila Tron	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Biológico
Promotora Técnica Industrial, S.A. de C.V.	SPECTRUM Pae L	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Biológico
Biocampo, S.A. De C.V.	Nematrol Plus	Quitosan	Orgánico
Agrobiológicos Del Noroeste, S.A. De C.V.	LILA-SIN WP	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Orgánico
Greencorp Biorganiks De Mexico, S.A. De C.V.	Nemaxxion Biol	<i>Bacillus</i> spp, Extracto de <i>Tagetes erecta</i>	Orgánico
Química Sagal, S.A	Nematar	Quitosan	Orgánico
Química Amvac de México, S.A. De C.V.	COUNTER FC-5% G	Terbufos	Químico Sistémico
Química Amvac de México, S.A. De C.V	NEMACUR 400 CE	Fenamifos	Químico
Química Amvac de México, S.A. De C.V	Mocap 15G	Etoprofos	Químico
Bayer de México S.A. De C.V.	Nemacur 240 S	Fenamifos	Químico Sistémico
Proindustrias de Occidente, S.A. De C.V.	Avance 5G	Terbufos	Químico.
Syngenta S.A. Madrid	Nemathorin 150	Fostiazato	Químico
Green Corp	Fullkover Mf	Jasmonatos +Chitosan	Orgánico
Green Corp	Best Ultra	Ácidos fulvicos, <i>Bacillus</i> spp, extracto de algas marinas y <i>Trichoderma</i> spp.	Orgánico

Fuente: Elaboración propia a partir de registros ante La Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y Diccionario de Insumos para la Producción Orgánica (DIPO) 2012.

La efectividad biológica de que un hongo interactúe de forma positiva en contra de los nematodos fitopatógenos, se debe a los mecanismos de acción nematófaga de las cepas de hongos mismas que se dividen en cuatro grupos (Moosavi y Zare, 2012):

- **Atrapa nematodos.** Estos hongos utilizan trampas adhesivas o hifas mecánicas para atrapar a sus presas, estos desarrollaron dos mecanismos

utilizados en la captura de los nematodos, el primero es la construcción de anillos y el segundo son las trampas adhesivas (Hyde *et al.*, 2014). Como ejemplo de este tipo de depredador de nematodo, se encuentra *Arthrobotrys* spp. (Gives *et al.*, 1994 y Arias *et al.*, 2013).

- **Endoparásitos.** Estos hongos son parásitos obligados que desarrollan todo su ciclo en el hospedero, pocas veces son saprófitos, infectan nematodos parásitos de plantas a través de sus esporas, éstas pueden ser ingeridas por el nematodo y posteriormente germinar dentro del propio nematodo o pueden adherirse a su cutícula para penetrar por medio de hifas. Un ejemplo de endoparásito es *Drechmeria coniospora* (Jasson, 1994; Ebadi *et al.*, 2009).
- **Parásitos de hembras y huevos.** Generalmente los hongos que parasitan huevos y quistes son más numerosos que aquellos que infectan a las hembras. Estos hongos pueden vivir en la rizósfera y han sido considerados como agentes de control prometedores, su mecanismo de acción utiliza apresorios de zoosporas para infectar a sus hospederos; entre los más utilizados se encuentran *Pochonia chlamydosporia* (Luambano *et al.*, 2015), *Haptocillium* sp., *Hirsutella* sp. y *Paecilomyces* sp., de este último, en el mercado de nematicidas, se cuenta con cepas comerciales de la especie *P. lilacinus* utilizadas en control biológico. Diferentes hongos nematófagos producen quitinasas que pueden ser importantes en el proceso de la infección de los huevos y las larvas de los nematodos. Un reciente estudio probó la acción nematicida de quitinasas extracelulares producidas por *Monacrosporium thaumasium* en el nematodo *Panagrellus redivivo* en donde la producción de enzimas quitinasas causó una reducción del 80% en el número de larvas de *P. redivivus*, en comparación con el grupo control (Freitas *et al.*, 2015).

- **Hongos productores de toxinas.** Estos hongos secretan una toxina que inmoviliza a los nematodos, previo a la penetración de la hifa a través de la cutícula del nematodo. Los efectos tóxicos del cultivo de hongos y extractos sobre los nematodos vermiformes y huevos han sido reportados por diferentes especies de hongos (Cuadro 5). Estos hongos producen *in vitro* componentes nematocidas y nematostáticos, aunque el papel que juegan de parasitismo *in vivo*, no se ha estudiado a fondo, por lo anterior la búsqueda de nuevos compuestos con actividad nematocida es un campo por explorar con más precisión (Moosavi y Zare, 2012).

2.6 Hongos productores de metabolitos nematotóxicos

Los hongos filamentosos tienen una estructura vegetativa característica denominada micelio, que se encuentra constituido por el conjunto de hifas ramificadas. Estos hongos sintetizan una amplia variedad de productos naturales nombrados metabolitos secundarios; éstos generalmente son moléculas de bajo peso molecular que no se requieren para el crecimiento o desarrollo del organismo productor, sin embargo se cree que ayudan al hongo a competir con éxito contra otros organismos en su hábitat natural. En consecuencia, muchos metabolitos secundarios tienden a ser compuestos con efectos tóxicos o inhibidores sobre otros organismos (Shwab y Keller, 2008). Su producción es un proceso complejo que a menudo se acopla con el desarrollo morfológico en hongos filamentosos; su síntesis también se puede vincular al proceso de esporulación (Calvo *et al.*, 2002), a la señalización en hongos, plantas, interacciones fúngicas, interacciones hongo-insecto y como protectores de estrés. Los hongos entomopatógenos también reportan un elevado número de metabolitos secundarios producidos. Mismos que han sido examinados y caracterizados, algunos pueden ser de estructura orgánica simple, pero con frecuencia son compuestos de estructura un poco más compleja, muchos de ellos son toxinas peptídicas que se derivan de otros metabolitos primarios (Borges *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos, la función exacta de metabolitos secundarios de los hongos, incluyendo *Metarhizium* spp., es desconocido (Krasnoff *et al.*, 2006), sin embargo más de 200 compuestos

nematicidas y nematostáticos que se han obtenido a partir de hongos, éstos pertenecen principalmente a alcaloides, quinonas, piranos, furanos, péptidos, macrólidos, terpenoides, ácidos grasos y aromáticos simples, entre otros y cerca de 280 especies de hongos en 150 géneros de Ascomycota y Basidiomycota se sabe que producen compuestos tóxicos que son activos contra los nematodos (Li y Zhang, 2014).

Entre los alcaloides que han probado aptitudes nematicidas se encuentra el alcaloide parahercuamida, mismo que fue aislado originalmente de *Penicillium paraherquei* (Yamazaki *et al.*, 1981), y seis analogos, obtenidos de *Penicillium charlesii* que poseían actividades nematicidas contra *Caenorhabditis elegans* con valores de DL₅₀ en el rango de 2.5 a 160 mg ml⁻¹ (Ondeyka *et al.*, 1990).

En diferentes estudios en donde no se especifica el metabolito nematicida o con actividad nematostática hacia los diferentes géneros de nematodos se utilizan los extractos de la fermentación de hongos, como es el caso de 13 cepas de *Fusarium oxysporum* que producen extractos de cultivo tóxicos para los nematodos, este hongo fue probado contra *Meloidogyne incognita* (Hallmann y Sikora 1996). Existen diferentes estudios en donde se utilizan no solo moléculas específicas, si no extractos de hongos en donde no se conoce el compuesto que actúa en el nematodo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Estudios realizados con extractos y compuestos de hongos con actividad nematicida y nematostática

COMPUESTO / EXTRACTO	HONGO	PRUEBA CON NEMATODOS	REFERENCIA
trans-2 ácido decanoico	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Panagrellus redivivus</i>	Kwok <i>et al.</i> (1992)
Fumiquinonas Pseurotina	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Bursaphelenchus xylophilus Pratylenchus penetrans</i>	Hayashi <i>et al.</i> (2007)
Extracto	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>M. incognita</i>	Sharma <i>et al.</i> (2014)
Extracto	<i>Acremonium implicatum</i>	<i>M. incognita</i>	Tian <i>et al.</i> (2014)
Extracto	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>M. incognita</i>	Hu <i>et al.</i> (2013)
Caetoglobosina	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>M. incognita</i>	Hu <i>et al.</i> (2013)
Extracto	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	Siddiqui y Husain (1991)
Extracto	<i>Aspergillus niger</i>	<i>M. incognita</i>	Siddiqui y Husain

			(1991)
Ácido linoleico	<i>Arthrotrrys brochopaga</i>		
	<i>A. conoides</i>	<i>M. incognita</i>	
	<i>A. dactyloides</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Anke <i>et al.</i> (1995)
	<i>Chlorosplenium</i> sp. <i>Dactylella candida</i>		
Ácido 3-Hidroxi propiónico	<i>Melanconium betulinum</i>	<i>M. incognita</i>	Schwarz <i>et al.</i> (2004)
Patulina, Ácido penicílico	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.	<i>M. incognita</i>	Li y Zhang (2014)
Beauvericina	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>M. incognita</i> .	
	<i>Fusarium bulbicola</i>	<i>C. elegans</i>	Li y Zhang (2014)
		<i>B. xylophilus</i>	
Extracto	<i>Stagonospora heteroderae</i>	<i>Heterodera glycines</i>	Chen y Dickson (2000)
Extracto	<i>Neocosmospora vasinfecta</i>	<i>H. glycines</i>	Chen y Dickson (2000)
Extracto	<i>Fusarium solani</i>	<i>H. glycines</i>	Chen y Dickson (2000)
Extracto	<i>Verticillium leptobactrum</i>	<i>M. incognita</i>	Regaieg <i>et al.</i> (2010)

2.6.1 Hongos endófitos

Los hongos endófitos son un grupo polifacético de microorganismos que pueden prosperar de forma asintomática en los tejidos de las plantas sobre el suelo, así como bajo la tierra, incluyendo los tallos, las hojas, y/o raíces (Kusari *et al.*, 2012). Los hongos endófitos que producen metabolitos tóxicos a los nematodos son agentes de biocontrol prometedores (Sikora *et al.*, 2008).

Investigaciones recientes muestran una relación compleja entre los endófitos de transmisión vertical que viven dentro de las gramíneas y las plagas que los atacan (Raman *et al.*, 2012). También se sabe que la presencia de hongos endófitos en pastos, ayudan a disminuir el desarrollo de nematodos, es el caso del hongo endófito *Neotyphodium coenophialum*, mismo que le confiere resistencia al pasto *Festuca alta*, a algunos nematodos parásitos de las plantas, además de ésta especie se aisló ergovalina, un alcaloide con actividad repelente y nematicida (Bacetty *et al.*, 2009).

Diferentes alcaloides del hongo *Claviceps purpurea* causante de la enfermedad Cornezuelo de Centeno interactúan como antagonistas en los receptores del neurotransmisor monoamina, serotonina, la dopamina, la adrenalina y la

noradrenalina (Panaccione *et al.*, 2014). Los neurotransmisores dopamina, serotonina y acetilcolina se han detectado en varias especies de nematodos (Sharpe y Akinson 1980; Stewart *et al.*, 2001) mismos que influyen en su comportamiento. La acetilcolina está involucrada en la locomoción, controlando iniciación de onda durante el movimiento, la puesta de huevos y en el comportamiento de apareamiento masculino (Hallam *et al.*, 2000; García *et al.*, 2001).

Algunas especies de plantas de la familia de gloria de la mañana (*Convolvulaceae*) también forman simbiosis con hongos endófitos de la familia Clavicipitaceae que producen liolina, un alcaloide con actividad nematocida (Bacetty *et al.*, 2009).

Undifilum oxtropis, es un endófito de la planta *Astragalus* sp. misma que produce el alcaloide swainsonina (Wu *et al.*, 2014). Además, se han reportado otras especies de hongos no descritos que forman simbiosis con las plantas de la familia *Convolvulaceae* para producir el alcaloide swainsonina (Cook *et al.*, 2014., Grum *et al.*, 2013), misma que se conoce como la toxina que produce síntomas crónicos neuro-musculares en el ganado de pastoreo después de que éste consume a las plantas hospederas de los hongos endófitos que lo producen. Es importante mencionar que se desconoce la actividad biológica de éste alcaloide en insectos y nematodos. Uno de los hongos filamentosos que producen este alcaloide es *Metarhizium anisopliae*.

2.6.2 Metabolitos secundarios obtenidos de *Metarhizium* spp

Metarhizium es un género de hongos entomopatógenos usados en todo el mundo como alternativa a los insecticidas químicos en los programas de control de plagas y enfermedades en vectores agrícolas. Diferentes cepas de *Metarhizium* se han reportado como productores de moléculas pequeñas, que tienen un efecto tóxico para los insectos o tienen uso médico potencial (Roberts y Leger., 2004). Entre los metabolitos que produce el hongo se encuentran las destruxinas, una clase de insecticidas, anti-viral y depsipéptidos cíclicos fitotóxicos que también se estudian por su toxicidad para las células cancerosas. Diversos hongos tienen la capacidad

de producirlas. Se ha establecido una relación directa entre la producción de destruxinas y la virulencia del entomopatógeno *M. anisopliae* (Pal *et al.*, 2007). Otros metabolitos que produce el hongo son el ácido oxálico y ácido 2, 6-piridindicarboxílico (Borges *et al.*, 2010). De la especie *Metarhizium flavoviride* fueron aislados los compuestos viridoxinas A y B que posteriormente se ensayaron en su actividad insecticida en larvas del escarabajo colorado de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*), en donde se determinó LC₅₀ de 40 y 50 ppm (Gupta *et al.*, 1993).

Entre los hongos productores de swainsonina, además del género *Undifilium* se sabe que el fitopatógeno *Rhizoctonia leguminicola*, es productor de swainsonina (Broquist, 1986 y Li *et al.*, 2012), al igual que el entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Patrick, 1993). La propuesta de ruta biocinética de swainsonina se basa en la establecida para *Rhizoctonia Leguminicola*. Swainsonina está presente en un número de especies de plantas y hongos de todo el mundo (Cook *et al.*, 2013); provoca toxicosis grave en el ganado de pastoreo (Wu *et al.*, 2014, Cook *et al.*, 2014).

La swainsonina posee una estructura típica de los alcaloides tipo indolizidinica, se conoce como la toxina que produce síntomas crónicos neuro-musculares cuando se ingiere por el ganado de pastoreo y la vida silvestre, los síntomas incluyen alteración neuronal severa, toxicidad para el sistema nervioso central y periférico es causada por la inhibición de la manosidasa lisosomal y la acumulación de oligosacárido intracelular. En consecuencia, swainsonina se ha utilizado como una sustancia modelo en investigaciones de enfermedades de almacenamiento lisosomal y su participación de los ganglios basales se ha postulado debido a los síntomas neuronales de los animales afectados (Li *et al.*, 2012)

En el campo de la medicina exhibe amplia inhibición de crecimiento y actividad pro-apoptótica (hace posible la destrucción de las células dañadas), razón por la que es un fármaco potencial utilizado para controlar un número de tipos de tumores (You *et al.*, 2012). En la cultura china se utilizaban plantas hospedadoras de hongos que producen swainsonina para diversos remedios, por ejemplo *Oxytropis*

glabra, productor de swainsonina, podía usarse para disminuir el dolor en las articulaciones o en las muelas, así como para clamar picazón en la piel (Zhao *et al.*, 2013). De acuerdo con Tamerler-Yildir *et al.* (1997), Skrobek y Butt (2005) y Sing y Kaur (2013) *M. anisopliae* cultivado en medio avena, produce swainsonina y diferentes metabolitos de naturaleza peptídica de los que no se conocen los efectos en insectos y nematodos.

III PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿Los extractos liofilizados obtenidos a partir de un cultivo de *Metharizium anisopliae* tienen efecto nematostático en *Nacobbus aberrans*?

IV HIPÓTESIS

- Al menos uno de los extractos liofilizados obtenidos a partir de un cultivo de *M. anisopliae* tiene actividad nematostática sobre *Nacobbus aberrans* en condiciones de laboratorio.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar el efecto nematostático de extractos liofilizados obtenidos individualmente por fermentación, a partir de tres cepas de *Metarhizium anisopliae*, sobre *Nacobbus aberrans* en condiciones de laboratorio.

5.2 Objetivos particulares

- Evaluar el crecimiento de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* en medio avena-glucosa.
- Evaluar la capacidad nematostática de tres extractos de *Metarhizium anisopliae* sobre *Nacobbus aberrans*.

VI METODOLOGÍA

Se trabajaron tres cepas de *M. anisopliae*: *UAM-X* (Laboratorio de Biotecnología de la UAM-Unidad Xochimilco), *Tac-1* y *Xoch-8* (Colección de hongos entomopatógenos del Departamento de Biotecnología de la UAM-Unidad Iztapalapa). La evaluación de su crecimiento y la obtención de los sobrenadantes liofilizados se realizó en el Laboratorio de Biotecnología; la evaluación de los tratamientos sobre los nematodos parásitos de plantas fue realizada en el Laboratorio de Fitopatología, ambos en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

6.1 Evaluación del crecimiento de tres cepas de *M. anisopliae*

6.1.1 Activación de cepas

Para la activación de las tres cepas, se inoculó 0.5 mL de cada cepa en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con medio Sabouraud. El inóculo se mantuvo en una cámara bioclimática a 28°C durante 15 días.

6.1.2 Obtención de aislados monospóricos

De cada cepa activada se hicieron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10,000 y 1:100,000; sembrándose por extensión 1 mL de cada suspensión en una caja Petri con medio PDA. Las cajas se incubaron a 28°C, revisándolas a las 24 y 48 horas. La porción de agar con la colonia fue trasladada a un matraz Erlenmeyer con 150 mL de PDA y colocado en incubación a 28°C. El cultivo monospórico se cosechó 15 días después de su siembra.

6.1.3 Producción de conidios

Los conidios precedentes del cultivo monospórico fueron cosechados en una solución de Tween 80 al 0.5% (v/v). El número de conidios se determinó por conteo directo en una cámara de Neubauer utilizando la siguiente fórmula:

$$N = n \times 25 \times 1000 \times FD \quad (\text{Cañedo y Ames, 2004})$$

Donde:

N= número de conidios (esporas mL⁻¹)

FD= factor de dilución

n= promedio de conidios (esporas por cuadrante)

$$n = \frac{\sum \text{de los cuadrados contados}}{\text{Número de cuadrados contados}}$$

6.1.4 Viabilidad de esporas

La viabilidad de las esporas se evaluó mediante la enumeración (cuenta indirecta) de las colonias de *M. anisopliae* que aparecen sobre cajas de Petri, con medio PDA. Después de sembrar una alícuota de 100µl de la dilución 1:100,000 de conidios (apartado 6.5), se incubó a 28°C; las esporas viables se contaron a las 48 horas (Roussos *et al.*, 1989). El porcentaje de viabilidad se determinó mediante la relación del número de esporas viables determinadas al tiempo del muestreo, con respecto de aquellas determinadas con la cámara Neubauer.

6.1.5 Crecimiento radial

El crecimiento radial se determinó a partir del diámetro de las colonias de las tres cepas de *M. anisopliae* (Gibson y Hocking, 1997) en cajas Petri con el medio harina de Avena 6%, Glucosa 2% y Agar 2%. El medio de cultivo se elaboró con avena granvita® entera, misma que fue triturada en una moladora Molinex® y posteriormente cribada en un tamiz WS TYLER® del No. 140.

Para el inóculo se tomaron tres alícuotas de 7.5 µl de la solución madre de conidios equivalente a 300 de éstos y se inocularon en el centro de cajas Petri y

se incubaron a 28°C. Posteriormente el crecimiento radial de las colonias de *M. anisopliae* se midió con un vernier Mituloyo® en intervalos de 24 horas (Gibson y Hocking, 1997).

6.1.6 Determinación de biomasa por peso seco

Para determinar la biomasa de los hongos, por cada cepa se preparó un total de 7 matraces con medio harina de Avena 1.5% y Glucosa 0.5% (AG). La avena (Granvita®) fue molida en una picadora Molinex® y posteriormente pasada a través de un tamiz WS TYLER® del No. 140. El medio fue preparado por cocción de harina de Avena a punto de ebullición durante un minuto; posteriormente el pH se ajustó a 5.0, y se esterilizó a 121°C durante 15 min. En cada matraz se inoculó una suspensión de 1×10^7 esporas mL⁻¹, los matraces fueron colocados en un agitador orbital GALLENKAMP® a 28° C y 180 rpm. La biomasa de cada cepa se filtró cada 24 h durante siete días, uno por matraz. La biomasa filtrada se lavó con agua destilada estéril y se colocó en estufa a temperatura constante de 60°C durante 96 horas (Justo *et al.*, 2007). Posteriormente el peso seco se cuantificó en una balanza analítica OAHUS®.

6.1.7. Determinación de la densidad superficial

La determinación de la densidad superficial fue estimada en el octavo día y correspondió a la relación de peso seco con crecimiento radial. El peso seco se obtuvo por filtración de la biomasa sobre papel Whatman 41 previamente seco y pesado, con posterior secado a estufa a 60°C durante 24 h. La diferencia entre el peso final y el inicial dividido por el área de la colonia corresponde a la densidad superficial expresada en mg/cm² (Vásquez, 2013).

6.2 Obtención de sobrenadante liofilizado

6.2.1 Medio de cultivo

El medio utilizado fue AG. Para estimular la síntesis de la swainsonina se adicionó 0.1 g L⁻¹ de L-lisina Sigma-Aldrich®, los tratamientos fueron: sin aplicación de

lisina y dos con aplicación al quinto y séptimo día, respectivamente, dando un total de tres fermentaciones diferentes por cepa.

6.2.2 Condiciones de fermentación

Para realizar la fermentación, una suspensión de 1×10^7 esporas por mililitro se inoculó en matraces Erlenmeyer de 250 mL y los cultivos se mantuvieron en un agitador orbital GALLENKAMP® a 180 rpm con temperatura constante de 28°C durante siete días.

6.2.3 Obtención del extracto liofilizados

Una vez detenida la fermentación, el contenido de los matraces se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos en una centrifugadora refrigerada Sorvall RC-5B® a una temperatura de 4°C. En el sobrenadante obtenido se cuantificó el contenido de proteínas mediante un espectrofotómetro con el método de Bradford (Bradford, 1976). El sobrenadante fue extracto a través de una membrana Whatman® de 0.45 µm para eliminar residuos sólidos. El extracto fue congelado en frascos viales durante 24 horas a -4°C y liofilizadas durante 48 h en una liofilizadora LABCONO®.

6.3 Establecimiento de las condiciones de *Nacobbus aberrans*

6.3.1 Origen e identificación de *Nacobbus aberrans*

Debido a que *N. aberrans* es un parasito obligado, se necesita obtener la planta hospedera con los nematodos. Para este experimento los nematodos se obtuvieron de raíces de jitomate (*Solanum lycopersicum*) variedad "Cid" infestadas de agallas de *N. aberrans*. Las plantas se colectaron en los invernaderos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Para la identificación de hembras, las raíces agalladas fueron teñidas con lactoglicerina + 1% de azul de algodón, mismas que se calentaron en un vaso de precipitado a punto de ebullición; posteriormente se enjuagaron con glicerina y agua destilada con el fin de disminuir el exceso de colorante (Coyne *et al.*, 2007);

15 días después las muestras fueron colocadas en un portaobjetos con excavado y observadas bajo un microscopio estereoscópico 100X OLYMPUS SZX9® y las hembras fueron separadas de las raíces con pinzas y agujas de disección estériles.

6.3.2 Incremento de la población

Bolsas negras calibre 700, con volumen de 1 L y con perforaciones de un 1 cm de diámetro en la base del contenedor se llenaron con una mezcla de sustrato preparada con peatmoss (Sunshine®, Canadá), perlita (agrolita®, México) y sustrato infectado en relación de peso 2:2:1 respectivamente (Vilchis-Martínez *et al.*, 2014). En cada bolsa se enterró una quinta parte de la raíz de jitomate variedad Cid, infestadas con agallas de *N. aberrans*. En cada bolsa con inóculo se trasplantó una plántula de jitomate variedad Moctezuma (Harris Moran), plantas a las que en intervalos de ocho días se les monitoreaban la radícula. Cuando se encontró la formación de agallas con un nivel 4 (Bridge y Sam Page, 1980) en Coyne 2007 las plantas se retiraron del contenedor y para el mantenimiento de la población de los nematodos, se incorporaron nuevas secciones de raíces agalladas.

6.3.3 Obtención de nematodos J2

Las raíces infectadas con nematodos se lavaron con agua potable, enseguida se retiró el exceso de agua con toallas estériles de la marca Sanitas®; posteriormente el índice de agallamiento se registró con base en el manual de Bridge y Page (1980) en el manual de Coyne *et al.* (2007).

En una balanza granataria se pesó un total de 30 gr de raíces con agallas, las raíces previamente se cortaron en trozos de 2 cm de longitud, los fragmentos de raíces agalladas se licuaron tres veces en una batidora Hamilton Beach® durante 10 segundos con intervalos del mismo tiempo (González *et al.*, 2014). La mezcla resultante se pasó por una columna de tamices de 40, 60, 100, 200, 325 y 400 mallas. Los huevos de *N. aberrans* se recolectaron de los tamices de 400 mallas

en un vaso de precipitado de 150 mL; posteriormente, los huevos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, e inmediatamente se lavaron con agua destilada (Cristóbal *et al.*, 2001, Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2015). En el vaso de precipitados que contenía los huevos del nematodo se colocó exudado de la raíz de plántulas de jitomate y se mantuvieron a temperatura constante de 25°C. Finalmente los estados J2 de *N. aberrans* se colectaron del fondo del recipiente a las 24 y 48 horas (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2015).

6.4 Efecto tóxico del sobrenadante liofilizado de *M. anisopliae* sobre *N. aberrans*

Para las pruebas de toxicidad se usaron nematodos activos J2. La unidad experimental consistió de 40 nematodos que se colocaron en un volumen de 10 mL de agua destilada conteniendo una concentración de 600 ppm del liofilizado de *M. anisopliae*. Esta solución fue vertida en cajas de Petri de 60x15 mm e introducida en una cámara de incubación a 25°C. A las 12, 24 y 72 h mediante un microscopio estereoscopio se evaluó la inmovilidad de los estados J2, para lo cual se les tocó con un alfiler entomológico montado en un mango porta asa; aquellos que no presentaron movimiento fueron cuantificados como organismos inactivos. Antes de realizar la observación en el microscopio, las cajas de Petri fueron suavemente agitadas de manera manual para dispersar los individuos e inmediatamente colocadas sobre una mica transparente, del diámetro de la misma caja, dividida en ocho cuadrantes.

6.5 Diseño experimental y análisis de datos

Para evaluar la capacidad nematotóxica de los extractos de *M. anisopliae*, se utilizó un diseño experimental completamente al azar en el que cada cepa se convirtió en un tratamiento, además del testigo que consistió en agua destilada. Cada tratamiento constó de cuatro repeticiones y cada unidad experimental incluyó 40 individuos del estado J2 de *N. aberrans*. Para el análisis de datos se realizó un análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo y pruebas de

Turkey ($p < 0.05$) fueron realizadas para detectar posibles diferencias entre tratamientos.

VII RESULTADOS

7.1 Evaluación del crecimiento de tres cepas de *M. anisopliae*

7.1.1 Activación de cepas

El crecimiento de las colonias en el medio no fue homogéneo, entre las cepas el micelio de afelpado cambió a algodonoso, así mismo se observaron diferentes tiempos para la esporulación y cada cepa presentó diferente tonalidad de color verde (Cuadro 6).

Cuadro 6. Características del crecimiento plurispórico de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* en medio Sabouraud

	<i>Uam-X</i>	Cepas <i>M. anisopliae</i> <i>Xoch - 8</i>	<i>Tac-1</i>
Crecimiento	Forma una superficie rugosa que cubre uniformemente el medio.	No cubre uniformemente el medio.	Cubre con mayor lentitud y uniformidad el medio.
Micelio	Blanco. Poca presencia de micelio	Blanco. Mayor presencia. Presenta micelio aéreo con textura afelpada.	Blanco. Menor presencia de micelio.
Esporulación	Color verde, se presenta al segundo día de crecimiento de micelio.	Color verde presencia de micelio que cubre con menor uniformidad el medio.	Color verde. Esporulación lenta.



Figura 3. Crecimiento plurispórico de *Metarhizium anisopliae* a los once días en medio SDA. A) *Uam-X*, B) *Xoch-8* y C) *Tac-1*.

7.1.2 Cultivos monospóricos

Posterior a la activación de las cepas en SDA, se sembró el monospórico de cada cepa en dos medios más (PDA y Harina de Avena).

El crecimiento de cultivo monospórico se obtuvo de la siembra por extensión en caja Petri en dilución 1:100000 (Figura 4a). De esta dilución se aisló el conidio germinado para sembrar el cultivo monospórico (Figura 4b).

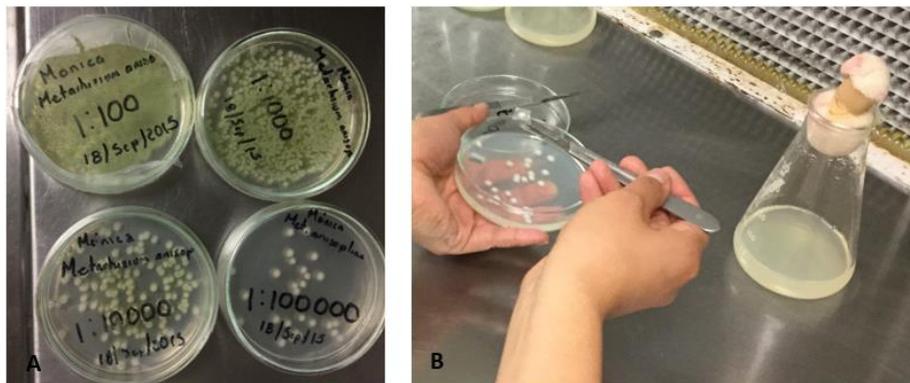


Figura 4. Crecimiento monospórico de *M. anisopliae* A) Crecimiento de la cepa *Uam-X* en cuatro diluciones consecutivas 1:10, 1:100, 1:1000, 1:100000 y B) siembra del cultivo monospórico.

Al sembrar las cepas en medio PDA se observó variación en el comportamiento de cada cepa; la cepa *Uam-X* formó una menor superficie rugosa en el cultivo monospórico que en el cultivo plurispórico, además en PDA difundió el pigmento verde al medio.

Los cultivos monospóricos sembrados en PDA crecieron en forma similar a los plurispóricos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Características del crecimiento del cultivo monospórico de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* en medio PDA

Cepa de <i>M. anisopliae</i>	Cepas		
	<i>Uam-Xoch</i>	<i>Xoch – 8</i>	<i>Tac-1</i>
Crecimiento	La colonia cubre uniformemente el medio	Formación de micelio aéreo con textura afelpada	Cubre con mayor lentitud y uniformidad el medio
Micelio	Color blanco Menor crecimiento	Color blanco crecimiento lento	Color blanco mayor presencia que en <i>Xoch-8</i>
Esporulación	Esporulación rápida Color verde agua	Esporulación Color verde olivo	Esporulación lenta Color verde
Envés de la caja	Amarillo-verde	Amarillo	Amarillo con centro café

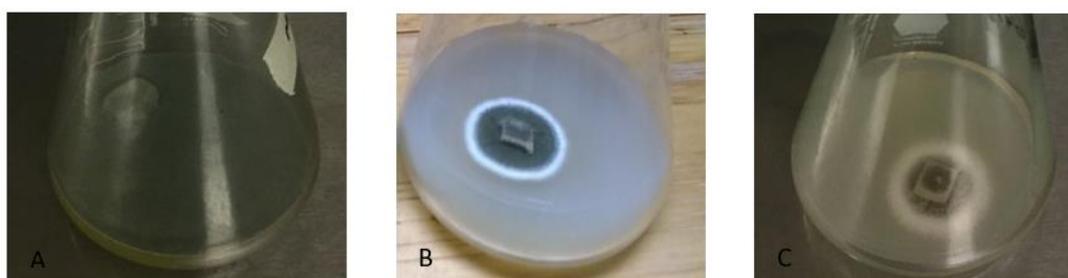


Figura 5. Crecimiento de cultivo monospórico de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* en medio PDA A) *Uam-X*, B) *Xoch-8* y C) *Tac-1*.

En el medio AGA las colonias de *M. anisopliae* de las cepas presentan morfología y color similar a las del medio PDA, así como su tiempo de esporulación en comparación con los medios anteriores. La pigmentación de la colonia en el fondo del matraz fue diferente: *Xoch-8* presentó una coloración amarilla, *Tac-1* amarillo con centro café y *Uam-X* color verde con matiz azul.

7.1.3 Producción de conidios

En la producción de conidios presentaron diferencias cuando el cultivo es plurispórico o monospórico. Las cepas de cultivos monospóricos *Uam-X* y *Tac-1* tuvieron una mayor producción de conidios que sus cultivos plurispóricos, a

diferencia de la cepa *Xoch-8* cuya producción en el cultivo plurispórico es mayor que en el monospórico (Cuadro 8).

Cuadro 8. Rendimiento de conidios de cepas monospóricas y plurispóricas de *Metarhizium anisopliae*

Cepa	Plurispórico	Monospórico
<i>Uam-X</i>	4.2×10^6	2.3×10^7
<i>Xoch-8</i>	1.4×10^6	1.1×10^6
<i>Tac-1</i>	2.7×10^6	3.1×10^6

7.1.4 Viabilidad

Las tres cepas presentan un porcentaje de viabilidad mayor de 90%; sin embargo, *Uam-X* destacó con el 97% de conidios germinados (Figura 6).

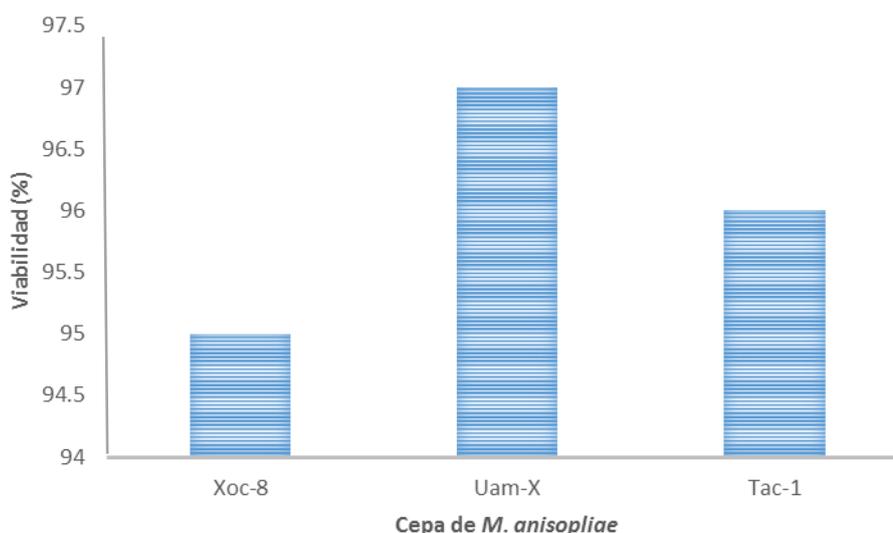


Figura 6. Porcentaje de viabilidad de tres cepas de *Metarhizium anisopliae*.

7.1.5 Velocidad de crecimiento

En el crecimiento radial medido durante nueve días (Figura 7) se observó una tendencia lineal en el crecimiento de las cepas de *M. anisopliae*. Alcanzando cerca de 2.5 cm en el octavo día.

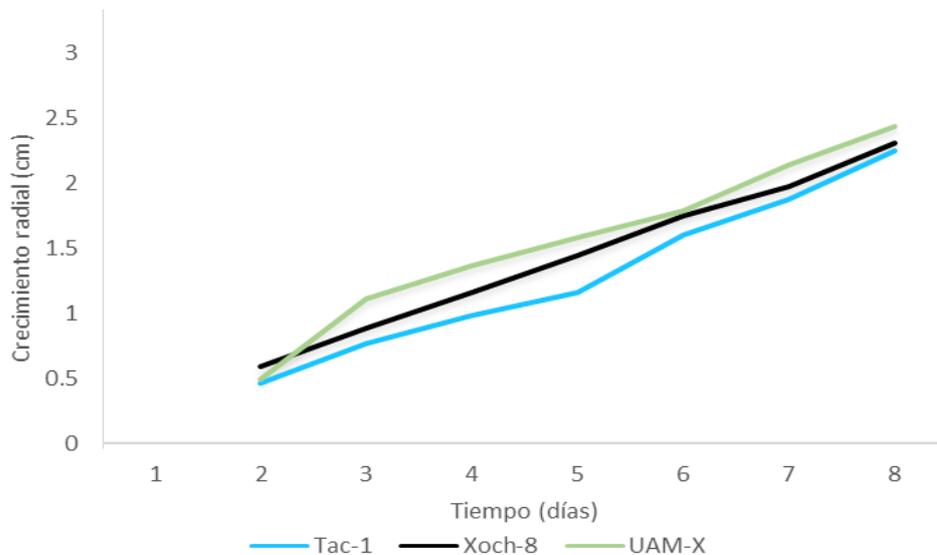


Figura 7. Crecimiento radial diario de las tres cepas de *Metarhizium anisopliae* Tac-1, Xoch-8 y Uam-X (promedio de tres repeticiones).

La velocidad de crecimiento radial entre las tres cepas no mostró diferencia significativa (Cuadro 9).

Cuadro 9. Velocidad de crecimiento radial de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* en caja Petri con medio de cultivo harina de avena.

Cepa	Velocidad de crecimiento radial (cm día ⁻¹)
<i>Tac-1</i>	0.242 ± .057 ^a
<i>Xoch-8</i>	0.2059 ± 0.010 ^a
<i>Uam -X</i>	0.249 ± 0.045 ^a

Superíndices diferentes dentro de la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

7.1.6 Biomasa por peso seco

La cepa *Tac-1* en medio AG al sexto día, fue quien registró la mayor generación de biomasa con un valor de 0.3091g, seguido de la cepa *Xoch-8* con un valor de 0.026g. La cepa *Uam-X* presentó una menor generación de biomasa en el medio AG con un promedio de 0.02315g (Figura 8).

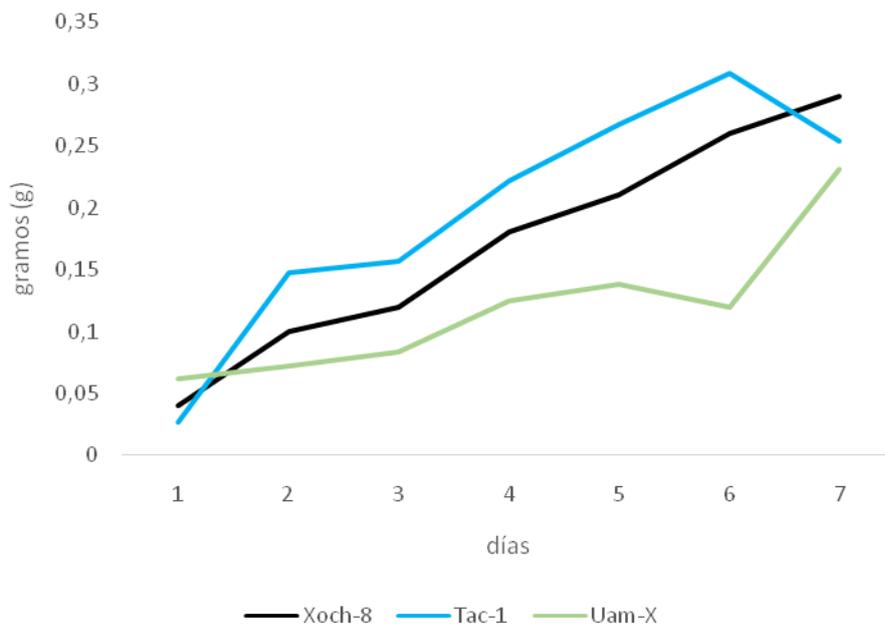


Figura 8. Peso acumulado de la biomasa de *Metarhizium anisopliae* en fermentación líquida con medio AG.



Figura 9. Producción de biomasa de *M. anisopliae* cepa *Xoch-8* en fermentación líquida con medio AG.

7.1.7 Densidad superficial

La densidad superficial se define como la relación entre el peso seco y el crecimiento radial y se puede observar en la figura 10 que la mayor densidad

superficial corresponde a la cepa *Xoch-8* con un valor de 17g /cm² continuando con la cepa *Tac-1* con un valor de 16 g/cm² y la menor biomasa fue generada por la cepa *Uam-X* con una densidad de 12 g/cm². Lo que sugiere que la cepa *Xoch-8* bajo estas condiciones tiene la capacidad de producir una mayor ramificación de las hifas, permitiendo una mayor biomasa en el medio.

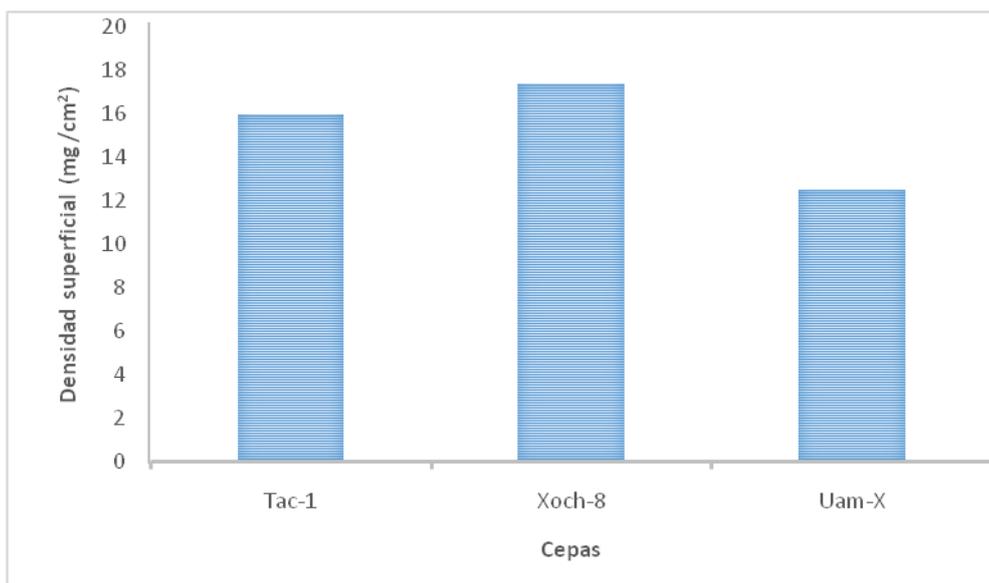


Figura 10. Comparación de la densidad superficial de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* en medio AG.

7.1.8 Cuantificación de péptidos

La cuantificación de proteínas en el sobrenadante está relacionada con moléculas de naturaleza peptídica producida por las cepas. El mayor contenido de péptidos lo presentaron las cepas *Tac-1* y *Xoch-8*, ambas sin la adición de lisina, en las cepas con aplicación de lisina fue menor la producción de péptidos y en general la cepa *Uam-X* mostró el nivel más bajo de producción de péptidos en todo el experimento (Cuadro 10).

Cuadro 10. Producción de péptidos de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* en fermentación líquida con medio AG S/L= Sin aplicación de lisina; L5 con aplicación 0.1g L⁻¹ de L-lisina al día 5 y L7 con aplicación 0.1g L⁻¹ de L-lisina al día 7.

Tratamiento	Péptidos mg/ml ⁻¹
<i>Tac-1</i> S/L	0.132019 ± 0.109 ^a
<i>Tac-1</i> L5	0.054474 ± 0.003 ^{ab}
<i>Tac-1</i> L7	0.047513 ± 0.011 ^{ab}
<i>Uam-X</i> S/L	0.018379 ± 0.006 ^{ab}
<i>Uam-X</i> L5	ND
<i>Uam-X</i> L7	ND
<i>Xoch-8</i> S/L	0.093305 ± 0.052 ^{ab}
<i>Xoch-8</i> L5	0.040278 ± 0.008 ^{ab}
<i>Xoch-8</i> L7	0.046535 ± 0.021 ^{ab}

Valores con diferente letra dentro de la misma columna son estadísticamente diferentes Tukey ($p < 0.05$). ND= No determinado.

7.2 Establecimiento de las condiciones de *Nacobbus aberrans*

Las plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Moctezuma se clasificaron (Figura 11) con un índice de agallas nivel 4 (Bridge y Sam Page, 1980).



Figura 11. Raíces de *Solanum lycopersicum* con presencia de agalladas: a) y b) raíces de *S. lycopersicum* variedad Moctezuma con agallas causadas por *Nacobbus aberrans* y c) índice de agallamiento con valor 4 Tomado y modificado de Coyne, 2007.

7.3 Efecto tóxico del extracto liofilizado de *M. anisopliae* sobre *N. aberrans*

Se observó un efecto tóxico altamente significativo ($p \geq 0.0009$) por el factor tiempo, o por el factor tratamiento ($p \geq 0.0001$). Sin embargo no se observó diferencia estadística significativa ($p \geq 0.9371$) como resultado del factor tratamiento por tiempo. Ello indica que no hay efecto toxico del extracto liofilizado de las cepas evaluadas a través del tiempo.

En la Figura 12 se presentan los valores de inmovilidad de nematodos J2 a través del tiempo en los intervalos de 24, 48 y 72 horas. Se observa una tendencia positiva en todos los tratamientos, lo que indica que la inmovilidad de los nematodos en presencia del liofilizado aumenta con el tiempo. También se observa que a las 24 horas la menor inmovilidad se presentó en el tratamiento testigo, mientras que la mayor inmovilidad se registró en el tratamiento *Xoch-8*. Durante 48 y 72 horas éste comportamiento se mantiene y el testigo mantiene su movilidad y el tratamiento *Xoch-8* muestra la mayor inmovilidad. Respecto a *Tac-1*, el extracto provoca un menor valor de inmovilidad que *Uam-X*, a las 24 horas. Sin embargo a las 48 y 72 horas el valor de inmovilidad es mayor que *Uam-X*, y ambas muestran un valor menor que *Xoch-8*.

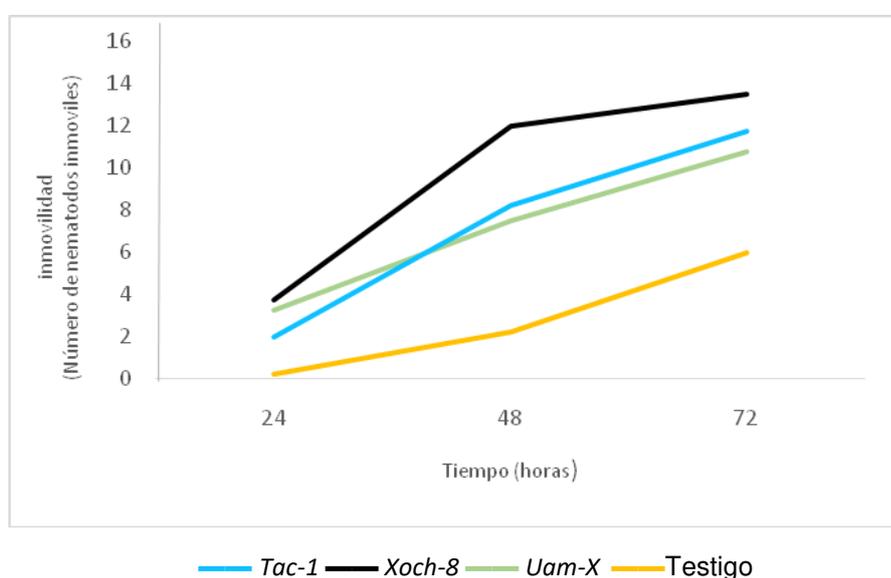


Figura 12. Promedio de inmovilidad en J2 de *Nacobbus aberrans* como respuesta a tres tiempos de exposición (24, 48 y 72 h) a extractos liofilizados de *Metarhizium anisopliae*.

VIII DISCUSIÓN

8.1 Producción de conidios y viabilidad de tres cepas de *M. anisopliae*

En el crecimiento de las tres cepas de *M. anisopliae* en tres medios diferentes permitió observar diferencias macroscópicas en cada cepa. El fenotipo de las cepas fue diferente de acuerdo al medio de crecimiento y las características genéticas de cada cepa, esto coincide con estudios realizados por Padilla-Melo *et al.* (2000), en donde existe alta variabilidad relacionada con el medio de crecimiento utilizado en el estudio, así como en cada aislamiento.

La cepa *Uam-X* obtuvo los valores más altos en la producción de conidios (2.3×10^7), viabilidad de esporas (97%) y crecimiento radial (0.492cm), sin embargo el rendimiento de conidios de las cepas utilizadas en el presente trabajo se encuentran por debajo del rendimiento de conidios de *M. anisopliae* M6, utilizada por Petlamul y Prasertsan (2012) quien reporta un rendimiento de 8.2×10^8 . En dos aislados reportados por Cruz-Avalos (2015) se obtuvo un rendimiento de 1.0×10^{10} conidios mL⁻¹ y el crecimiento radial fue de 3.07 y 3.06 mm día⁻¹. En el trabajo mencionado, los aislados fueron cultivados en Agar Dextrosa Sabouraud enriquecido con 1% de extracto de levadura, 500 ppm de cloranfenicol, incubándose a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% HR. El rendimiento de producción de conidios y crecimiento radial en las cepas crecidas con medio AG es menor posiblemente porque se midió el crecimiento radial durante 7 días, a diferencia de Cruz-Avalos (2015) que lo midió durante 15 días. Además de que no se utilizó un medio enriquecido y las concentraciones de avena y glucosa fueron bajas.

La viabilidad es uno de los factores contemplados en la evaluación de control de calidad en las esporas cosechadas de hongos entomopatógenos, en donde la viabilidad de los conidios no debe ser menor de 95% (Monzón, 2001). En este sentido, las cepas utilizadas corresponden a los niveles aceptables de viabilidad con porcentajes del 95, 96 y 97% para *Xoch-8*, *Tac-1* y *Uam-X* respectivamente. Aun así, las cepas presentaron valores similares a los reportados por Cruz-Avalos (2015), cuya cepa excedió el 98% de viabilidad para cepas de *M. anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumorosea*.

8.2 Crecimiento, biomasa y producción de péptidos en el medio AG

La cepa *Xoch-8* obtiene los valores más altos de biomasa por peso seco y densidad superficial, sin embargo *Tac-1* muestra el mayor contenido de péptidos (Cuadro 11).

Cuadro 11. Evaluación de tres cepas de *Metarhizium anisopliae*

Parámetros evaluados	<i>Uam-X</i>	<i>Tac-1</i>	<i>Xoch-8</i>
Producción de conidios (conidios mL ⁻¹)	2.3x10 ⁷	3.1x10 ⁶	1.1x10 ⁶
Viabilidad de esporas (%)	97	96	95
Velocidad de crecimiento (cm)	0.249	0.242	0.2059
Biomasa por peso seco (g)	0.2315	0.2541	0.29
Densidad superficial (mg/cm ²)	12.45	15.92	17.34
Concentración de péptidos (mg mL ⁻¹)	0.0185	0.1321	0.0934

En el crecimiento radial la cepas de *Uam-X* y *Tac-1* de *M. anisopliae* presentan crecimiento similar, 2.49 y 2.42 mm día⁻¹ respectivamente, pero mayor que *Xoch-8* con 2.05 mm día⁻¹. Sin embargo todas presentan un crecimiento menor a la cepa de *M. anisopliae* Ma13 con 3.60 mm día⁻¹ reportada por Cruz-Avalos (2015). Los datos anteriores entran en el rango de 1.3 a 3.6 mm día⁻¹ de cuatro aislados de *M. anisopliae* reportados por Cruz- Avalos (2015).

El crecimiento de *M. anisopliae* presenta una menor velocidad de crecimiento radial que el reportado para *Beauveria bassiana* por Petlamul y Prasertsan (2012), en el trabajo mencionado posiblemente el manejo controlado de condiciones como humedad relativa y manejo de luz-oscuridad favorezca el crecimiento radial de la cepa debido a que el manejo de 12:12 h luz-oscuridad promueve el crecimiento del micelio sin conidios (Lawrence y Khan, 2009; Cruz-Avalos 2015).

El contenido proteico encontrado en el extracto de las tres cepas sugiere que podría tratarse de algún grupo de toxinas de naturaleza peptídicas, las toxinas peptídicas cíclicas son conocidas como depsipeptidos; de ésta naturaleza de toxinas se han encontrado en otros hongos la Beauvericina, las Efrapeptinas,

Kantomicina, Bassiacridina. En el caso específico de *M. anisopliae* podríamos encontrar los depsipéptidos llamados destruxinas (Borges *et al.*, 2010). Con los resultados de cuantificación de proteínas se esperaría que las cepas *Tac-1* y *Xoch-8* tuvieran los mejores resultados en el control de J2 de *N. aberrans*, puesto que presentan un mayor contenido de proteínas, por lo tanto existe la posibilidad de que en el extracto se encuentren algunas moléculas con efectos insecticidas o citotóxicos (Liu *et al.*, 2007). A la fecha se han encontrado 39 destruxinas identificadas que poseen diferente actividad biológica como antitumoral, antiviral, insecticida, citotóxica, inmunosupresora y fitotóxica (Liu y Tzeng, 2012), por lo tanto el tipo de toxinas que se pueden encontrar en el liofilizado sería de origen peptídico como es el caso de las destruxinas y diferentes metabólicos tóxicos a plagas (Borges, 2010).

8.3 Extractos liofilizados de *M. anisopliae* sobre *N. aberrans*

La aplicación de los extractos liofilizados de *M. anisopliae* en los juveniles J2 de *N. aberrans* muestran una diferencia de comportamiento con el testigo. Las cepas entre sí se comportan de forma similar al provocar el estado de diapausa o inmovilidad en los nematodos J2 de *N. aberrans*.

A las 48 horas de exposición al liofilizado para la cepa *Uam-X* se presentó un 18.75% de inmovilidad, *Tac-1* mostró 20.5% y *Xoch-8* el 30%, mientras que el testigo muestra 5% de inmovilidad. Tian *et al.* (2014) observó un 5% de mortalidad para *M. incognita*; en su testigo se utilizó caldo de dextrosa de papa, mientras que en el presente trabajo se utilizó agua destilada. En el ensayo *in-vitro*, en el mismo rango de tiempo, 96% de los juveniles de segunda etapa de *M. incognita* resultaron muertos por el extracto de cultivos de *Acremonium implicatum*. La respuesta a los extractos liofilizados aplicados a *N. aberrans* no mostró mortalidad, sin embargo influyó en la inmovilidad, misma que se incrementó conforme al tiempo de exposición de los liofilizado a los J2. El efecto biológico causado por *Xoch-8* y *Tac-1* en *N. aberrans* puede estar relacionada con la producción de

péptidos (Figura 10) con actividad tóxica hacia el nematodo. Lo anterior, puede tener correspondencia con el grupo llamado destruxinas que son sintetizados por *M. anisopliae* y tienen amplia actividad biológica como insecticida, fungicida y nematicida (Carollo *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Ghayedi y Abdollahi, 2013). Aunque se desconoce de forma precisa el efecto de acción de *Metarhizium* sp. en diferentes nematodos (Ghayedi y Abdollahi, 2013). Puede ser que la actividad biológica que producen los liofilizados de *M. anisopliae* en *N. aberrans* se encuentre relacionada con lo que provocan moléculas de naturaleza peptídica que en el caso de *Metarhizium anisopliae*, las ampliamente estudiadas son las destruxinas y sus efectos en los insectos incluyen: parálisis flácida, contracción de músculo visceral, parálisis tetánica, inhibición del ADN y la síntesis de ARN en las líneas de células de insectos, inhibición de Malpighian y Secreción de líquido tubular, inhibidor de ATPasa y bloqueadoras de canal de calcio que suprimen las respuestas de defensa de los insectos (Wang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2007) ocasionando posible efectos alimentarios, por lo que se puede pensar que los liofilizados no solo causen falta de movilidad, si no también propician un efecto antialimentario (Golo *et al.*, 2014), lo anterior se tiene que evaluar en posteriores trabajos.

Es necesario señalar que experimentos de otros autores (Ebadi *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2014) han utilizado al menos cinco repeticiones en experimentos similares. Dado que en el presente experimento se utilizaron sólo cuatro repeticiones, ello podría haber influido en que los datos estadísticos obtenidos no hayan mostrado diferencia entre tratamiento, pero si una tendencia positiva en el efecto inmovilizador de *M. anisopliae* sobre *N. aberrans*

En un estudio de exposición a extractos del hongo *C. globosum* en J2 de *M. incognita* se obtuvo el 81% de mortalidad a las 72 horas y una molécula purificada del mismo hongo. También en el mismo tiempo de exposición obtuvo una mortalidad del 99.8% de J2 a 300µg mL⁻¹ (Hu *et al.*, 2013), aunque el trabajo mencionado utiliza diferente hongo y nemátodo se muestra el efecto nematicida más efectivo en moléculas purificadas, en el caso de *N. aberrans* se observa una

respuesta más rápidas si se trata de moléculas específicas como el caso del fluensulfone que redujo el movimiento de nematodos en los primeros 10 minutos (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2015). Por lo que es importante continuar en la búsqueda, identificación y purificación de moléculas con eficiencia en el control de *N. aberrans*.

Si bien existe un efecto biológico en la aplicación de los liofilizados de la cepas de *M. anisopliae*, es necesario realizar otro tipo de estudios, como los realizados por Hallmann y Sikora (1996), quienes probaron el efecto de los extractos de *Fusarium oxysporum* en nemátodos fitófagos, micófagos y bacteriófagos para determinar si existe selectividad en la aplicación.

IX. CONCLUSIONES

Para las variables viabilidad, velocidad de crecimiento, biomasa seca, densidad superficial y cuantificación de péptidos no se encontraron diferencias significativas entre las tres cepas estudiadas.

El análisis estadístico no mostró un efecto nematostático significativo del extracto liofilizado de *M. anisopliae* sobre J2 de *N. aberrans*. Sin embargo, desde el punto de vista biológico si se observa una tendencia positiva de inmovilización de los tres extractos sobre *N. aberrans*.

X. LITERATURA CITADA

- Anke, H., Stadler, M., Mayer, A. and Sterner, O. 1995. Secondary metabolites with nematicidal and antimicrobial activity from nematophagous fungi and Ascomycetes. *Canadian Journal of Botany* 73(1):932-939.
- Arias, M., Suarez, J., Cazapal-Monteiro, C., Francisco, I., Lopez-Arellano, M. and Pineiro, P. 2013. Trematodes enhance the development of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys* (Duddingtonia) *flagrans*. *Fungal Biology* 117(7-8):540-544.
- Bacetty, A. A., Snook, M. E., Glenn, E.A., Noe, J.P., Nagabhyru, P. and Bacon, C. W. 2009. Chemotaxis disruption in *Pratylenchus scribneri* by tall fescue root extracts and alkaloids. *Journal of Chemical Ecology* 35:844-850.
- Borges, D., Díaz, A. O., San Juan, A. N. and Gómez, E. 2010. Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la caña de azúcar* 44(3):49-55.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254.
- Broquist, H. 1986. Slaframine and swainsonine, mycotoxins from *Rhizoctonia leguminicola*. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews* 5(2):241-252.
- Byrd, D.C., Kirkpatrick, T. J. and Barker, K.R. 1983. An improved technique for cleaning and staining plant tissue for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15:142-143.
- Cabrera-Hidalgo, A. J., Valadez-Moctezuma, E. and Marban, M. N. 2015. Effect of fluensulfone on the mobility *in-vitro*, and reproduction and root galling of *Nacobbus aberrans* in microplots. *Nematropica* 45(1):59-71.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. and Keller, N. P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3):447-459.

- Cano, E., Carballo, M., Chaput, P., Fernández, O., González, L., Gruber, A. K. and Salazar, D. 2004. Control Biológico de Plagas. Ed. Managua. *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza*. Nicaragua 224p.
- Cañedo, V. y Ames, T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. *Centro Internacional de la Papa*. Lima, Perú. 62 p.
- Carollo, C. A., Calil, A. L. A., Schiave, L. A., Guaratini, T., Roberts, D. W., Lopes, N. P. and Braga, G. U. 2010. Fungal tyrosine betaine, a novel secondary metabolite from conidia of entomopathogenic *Metarhizium* spp. fungi. *Fungal Biology* 114(5):473-480.
- Cepeda, S. M. 1996. Nematología Agrícola. Ed. Trillas. México. 305p.
- Chen, S. Y. and Dickson, D. W. 2000. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 32(1):117.
- Chen, S., Kurle, J., Malvick, D., Potter, B. and Orf, J. 2011. Soybean Cyst Nematode. Management Guide. University of Minnesota, Minnesota. USA. 27p.
- Cid del Prado, V. I., Cristobal-Alejo, J., y Evans, K. 1997. Manejo de poblaciones de *Nacobbus aberrans* en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Nematopica*, 27:103-104.
- Cook, D., Beaulieu, W. T., Mott, I. W., Riet-Correa, F., Gardner, D. R., Grum, D. and Marcolongo-Pereira, C. 2013. Production of the alkaloid swainsonine by a fungal endosymbiont of the ascomycete order chaetothyriales in the host *Ipomoea carnea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(16):3797-3803.
- Cook, D., Gardner, D. R. and Pfister, J. A. 2014. Swainsonine-containing plants and their relationship to endophytic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:7326-7334.
- Coyne, D.L., Nicol, J.M. and Claudius-Cole, B. 2007. Practical Plant Nematology: a Field and Laboratory Guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA) Cotonou, Benin. 82 p.

- Cristóbal, A. J., Cid del Prado, V., Marbán-Mendoza, N., Sánchez, G. P. y Mora-Aguilera, G. 2001. Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. *Nematropica* 31(2):227-234.
- Cruz-Avalos, A. M., Cruz-Vázquez, C., Lezama-Gutierrez, R., Vitela-Mendoza, I. and Ángel-Sahagún, C. 2015. Selection of isolates of entomopathogenic fungus for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 18:175-180.
- Davies, K., and Spiegel, Y. 2011. Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms (Vol. 11). Springer Science & Business Media. New York 311p.
- DIPO, 2012. Diccionario de Insumos para la Producción Orgánica y Manejo Integrado de Plagas. 2ª Ed. México. 196p.
- Ebadi, M., Fatemy, S. and Riahi, H. 2009. Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* as a control agent of *Meloidogyne javanica* on pistachio. *Biocontrol Science and Technology* 19(7):689-700.
- FAO, 2002. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030; Departamento Económico y Social. Disponible en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/y3557s>
- FAOSTAT, 2014. Consumo de plaguicidas en México. Disponible en <http://faostat3.fao.org/browse/R/RP/S>
- Flores-Camacho, R., Atkins, S.D., Manzanilla-López, R. H., Prado-Vera, I.C. D. y Martínez-Garza. Á. 2008. Caracterización de aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *Chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare para el control biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26(2):93-104.
- Franco, J., Ramos, J., Oros, R., Maín, G. M. and Ortuño, N. 1999. Pérdidas económicas causadas por *Nacobbus aberrans* y *Globodera* spp. en el cultivo de la papa en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa* 11(1): 40-66.
- Franco, N. F., Cid del Prado V. I., Tejeda, R., y De la Luz, M. 2012. Aislamiento y potencial parasítico de un aislamiento nativo de *Pochonia*

- chlamydosporia* en contra de *Nacobbus aberrans* en frijol. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30(2):101-114.
- Freitas, S. F., Queiroza, J. H., Araujo, J. V., Queiroz, P. V., De Sousa, G. A., Hiura, E. and Ribeiro, B. F. 2015. Nematicidal action of chitinases produced by the fungus *Monacrosporium thaumasium* under laboratorial conditions. *Biocontrol Science and Technology* 25(3):337-344.
- García, L. R., Mehta, P. and Sternberg, P. W. 2001. Regulation of distinct muscle behaviors controls the *C. elegans* male's copulatory spicules during mating. *Cell* 107(6):777-788.
- Ghayedi, S. and Abdollahi, M. 2013. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae), Isolated from suppressive soils of the boyer-ahmad region, Iran, against J2s of *Heterodera avenae*. *Journal of Plant Protection Research* 53(2):165-171.
- Gibson, A.M. and Hocking, A. D. 1997. Advances in the predictive modeling of fungal growth in food. *Trends of Food Science and Technology* 8(11):353-358.
- Gives, P., Zavaleta-Mejia, E., Herrera-Rodriguez, D. and Quiroz-Romero, H. 1994. *In vitro* trapping capability of *Arthrobotrys* sp on infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Nacobbus aberrans*. *Journal Helminthol* 68: 223-229.
- Golo, P. S., Gardner, D. R., Grilley, M. M., Takemoto, J. Y., Krasnoff, S. B., Pires, M. S., Fernandes, E. K. K., Bittencourt, V. R. E. P. and Roberts, D. W. 2014. Production of destruxins from *Metarhizium* spp. fungi in artificial medium and in endophytically colonized cowpea plants. *Plos One* 9(8):1-9.
- González, C. C., Castaño, Z. J. y Aristizabal, L. M. 2014. Evaluación de un producto nematicida sobre nematodos fitoparásitos del plátano Dominicano Hartón (*Musa AAB*). *Acta Agronómica* 63(1):1-12.
- Grum, D. S., Cook, D., Baucon, D., Mott, I. W., Gardner, D. R., Creamer, R. and Allen, J. G. 2013. Production of the alkaloid swainsonine by a fungal endophyte in the host *Swainsona canescens*. *Journal Natural Product* 76(10):1984-1988.
- Gupta, S., Krasnoff, S. B., Renwick, J. A. A., Roberts, D. W., Steiner, J. R. and Clardy, J. 1993. Viridoxins A and B: novel toxins from the fungus

- Metarhizium flavoviride*. *The Journal of Organic Chemistry* 58(5):1062-1067.
- Hallam, S., Singer, E., Waring, D. and Jin, Y. 2000. The *C. elegans* neuro D homolog *cnd-1* functions in multiple aspects of motor neuron fate specification. *Development* 127(19):4239-4252.
- Hallmann, J., Rodríguez-Kábana, R. and Kloepper, J. 1999. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry* 31(4): 551-560.
- Hallmann, J. y Sikora R.A. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102(2):155-162.
- Hayashi, A., Fujioka, S., Nukina, M., Kawano, T., Shimada, A. and Kimura, Y. 2007. Fumiquinones A and B, nematicidal quinones produced by *Aspergillus fumigatus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71(7): 1697-1702.
- Hernández-Ochandia, D., Arias, Y., Gómez, L., Peteira, B., Miranda, I. y Rodríguez, M. G. 2012. Elementos del ciclo de vida de población cubana de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en *Solanum lycopersicum* L. *Revista de Protección Vegetal* 27(3):188-193.
- Hockland, S., Niere, B., Grenier, E., Blok, V., Phillips, M., Den, N. L. and Viaene, N. 2012. An evaluation of the implications of virulence in non-European populations of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* for potato cultivation in Europe. *Nematology* 14(1):1-13.
- Hu, Y., Zhang, W., Zhang, P. and Ruan, W. Z. X. 2013. Nematicidal activity of chaetoglobosin A produced by *Chaetomium globosum* NK102 against *Meloidogyne incognita*. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 61(1):41-46.
- Hyde, K., Swe, A. and Zhang, K. 2014. Nematode-Trapping Fungi. In: Nematode-Trapping Fungi. Springer 1-392.

- Inserra, R. N., Di Vito, M. and Ferris, H. 1984. Influence of *Nacobbus aberrans* densities on growth of sugarbeet and kochia in pots. *Journal of Nematology* 16(4):393-395.
- Jasson, H. B. 1994. Adhesion of conidia of *Drechmeria coniospora* to *Caenorhabditis elegans* wild type and mutants. *Journal of Nematology* 26(4):430-435.
- Jones, T. J., Haegeman, A., Danchin, J. E., Gaur, S. H., Helder, J., Jones, K. M. and Perry, N. R. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14(9):946-961.
- Justo, O. R., Calheiros, C. S., Pérez, V. H. and Alegre, R. M. 2007. Screening of *Metarhizium* spp. strains for anticancer indolizidine alkaloid production and its rapid detection by MS analysis. *Brazilian Journal of Microbiology* 38(4):780-784.
- Krasnoff, S. B., Sommers, C. H., Moon, Y. S., Donzelli, B. G., Vandenberg, J. D., Churchill, A. C. and Gibson, D. M. 2006. Production of mutagenic metabolites by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(19):7083-7088.
- Kusari, S., Hertweck, C. y Spiteller, M. 2012. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology* 19(7): 792-798.
- Kwok, O., Plattner, R., Weisleder, D. and Wicklow, D. 1992. A nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. *Journal of Chemical Ecology* 18(2): 127-136.
- Lawrence, A.A. and Khan, A. 2009. Variation in germination and growth rates of two isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota: Hyphomycetes) at different temperatures and their virulence to *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Entomology* 6:102-108.
- Li, G. H. and Zhang, K. Q. 2014. Nematode-toxic fungi and their nematicidal metabolites. In *Nematode-Trapping Fungi Yunnan China: Fungal Diversity Research*. p 313-376. Springer, Netherlands.

- Li, H., Gao, R., Liu, Y., Wang, J., Hu, Y., Yang, Z. and Creamer, R. 2012. Proteomics analysis of *Rhizoctonia leguminicola*, the phytopathogenic fungus that produces slaframine and swainsonine. *Journal of Food Agriculture and Environmen* 10(2):956-961.
- Liu, B. L., and Tzeng, Y. M. 2012. Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnology advances* 30(6):1242-1254.
- Liu, B. L., Rou, T. M., Rao, Y. K., Tzeng, Y. M. 2007. Effect of pH and aeration rate on the production of destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. *International Journal of Applied Science and Engineering* 5(1):17-26.
- Lilley, C. J., Kyndt, T. and Gheysen, G. 2011. Nematode resistant GM Crops in industrialised and developing countries. *In Genomics and Molecular Genetics of Plant-nematode Interactions*, p 517-541. Springer, Netherlands.
- Luambano, N. D., Manzanilla-López, R. H., Kimenju, J. W., Powers, S. J., Narla, R. D., Wanjohi, W. J. and Kerry, B. R. 2015. Effect of temperature, pH, carbon and nitrogen ratios on the parasitic activity of *Pochonia chlamydosporia* on *Meloidogyne incognita*. *Biological Control* 80:23-29.
- Manzanilla-Lopez, R., Costilla, M., Doucet, M., Inserra, R., Lehman, P., Prado Vera, I. and Evans, K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne and Allen. 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32(2):149-227.
- Martínez-Fuentes, R., Tovar-Soto, A. y Torres-Coronel, R. 2010. Penetración y establecimiento de *Nacobbus aberrans* [(Thorne 1933) Thorne y Allen), 1944] población Chapingo en cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(1):61-63.
- Montes, B. 2000. Nematología Vegetal en México. Investigación documental. México. Segunda edición. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Cd. Obregón, Sonora, México. 98 p.
- Moosavi, M. R. and Zare, R. 2012. Fungi as biological control agents of plant-parasitic nematodes. *In Plant Defence: Biological Control* p 67-107. Springer Netherlands.

- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas* 63:95-103.
- Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., Den Nijs, L., Hockland, S. and Maafi, Z. T. 2011. Current nematode threats to world agriculture. In *Genomics and Molecular Genetics of Plant-nematode Interactions*. p 21-43. Springer Netherlands.
- NOM-010-FITO-1995. Norma Oficial Mexicana, Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas del plátano. .
- NOM-011-FITO-1995. Norma Oficial Mexicana, Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de los cítricos.
- NOM-013-FITO- 1995. Norma Oficial Mexicana, Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de arroz.
- NOM-014-FITO-1996. Norma Oficial Mexicana, Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas del algodón.
- NOM-017-FITO-1995. Norma Oficial Mexicana, Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de trigo.
- NOM-018-FITO-1995. Norma Oficial Mexicana, Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas del maíz.
- NOM-040-FITO-2002. 1995. Norma Oficial Mexicana, Requisitos y especificaciones para la producción y movilización nacional de papa comercial.
- Ondeyka, J. G., Goegelman, R. T., Schaeffer, J. M., Kelemen, L. and Zitano, L. 1990. Novel antinematodal and antiparasitic agents from *Penicillium charlesii*. I. Fermentation, isolation and biological activity. *Journal of Antibiotics* 43(11):1375-1379.
- Pal, S., Leger, R. J. S. and Wu, L. P. 2007. Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry* 282(12):8969-8977.
- Panaccione, D. G., Beaulieu, W. T. and Cook, D. 2014. Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. *Functional Ecology* 28(2):299-314.

- Patrick, M., Adlar, M., and Keshavars, T. 1993. Production of an indolizidine alkaloid, swainsonine by the filamentous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol Lett* 15:997-1000.
- Petlamul, W. and Prasertsan, P. 2012. Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. *Mycobiology* 40(2):111-116.
- Putten, V., H, W. and Stoel, V. 1998. Plant parasitic nematodes and spatio-temporal variation in natural vegetation. *Applied Soil Ecology* 10(3):253-262.
- Raman, R., Wheatley, W. and Popay, A. 2012. Endophytic fungus-vascular plant-insect interactions. *Environmental Entomology* 41(3):433-447.
- Regaieg, H., Ciancio, A., Raouani, N. H., Gaetano, G. and Rosso, L. 2010. Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(12):2285-2289.
- Roberts, D. W. and Leger, R. J. S. 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology* 54:1-70.
- Robbins, R. T. 1982. Phytoparasitic nematodes of non-cultivated habitats in Arkansas. *Journal of Nematology* 14:466-467.
- Roussos, S., Aquihuatl, M. A., Brizuela, M. A., Olmos, A., Rodríguez, W. y Viniegra, G. 1989. Producción, conservación y viabilidad de inóculo de hongos filamentosos para las fermentaciones sólidas. *Micología Neotropical Aplicada* 2:3-17.
- Schwarz, M., Kopcke, B., Weber, R. W., Sterner, O. and Anke, H. 2004. 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi. *Phytochemistry* 65(15):2239-2245.
- SENASICA, 2014. Certificación de empresas de plaguicidas de uso agrícola. SAGARPA. México.

- Sharma, A., Sharma, S. and Dalela, M. 2014. Nematicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* 6029 cultured on Karanja cake medium. *Microbial Pathogenesis* 75:16-20.
- Sharpe, M. J. and Atkinson, H. J. 1980. Improved visualization of dopaminergic neurons in nematodes using the glyoxylic acid fluorescence method. *Journal of Zoology* 190:273-284.
- Shwab, E. K. and Keller, N. P. 2008. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological research* 112(2):225-230.
- Siddiqui, Y., Ali, A. and Naidu, Y. 2014. Histopathological changes induced by *Meloidogyne incognita* in some ornamental plants. *Crop Protection* 65:216-220.
- Siddiqui, Z. and Husain, S. 1991. Control of *Meloidogyne incognita* y *Macrophomina phaseolina* of chickpea by fungal filtrates. *Pakistan Journal Nematology* 9(2):131-137.
- Sikora, R. A., Pocasangre, L., Felde, A. Z., Niere, B., Vu, T. T. and Dababat, A. A. 2008. Mutualistic endophytic fungi and in-plant suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control* 46(1):15-23.
- Silva, J., Marban M. N., Teliz O. D., Zavaleta M. E., Cid del P, I., Zamudio, G. 1989. Manejo de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935), Thorne y Allen, 1944, asociado al cultivo de frijol en el Valle de Valsequillo, Puebla. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Instituto de Fitopatología.
- Singh, D. and Kaur, G. 2013. Real encoded genetic algorithm and response surface methodology to optimize production of an indolizidine alkaloid, swainsonine, from *Metarhizium anisopliae*. *Folia microbiologica* 58(5):393-401.
- Skrobeck, A. and Butt, T. M. 2005. Toxicity testing of destruxins and crude extracts from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters* 251(1)23-28.

- Stewart, G. R., Perry, R. N. and Wright, D. J. 2001. Occurrence of dopamine in *Pangrellus redivivus* and *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 3(8):843-858.
- Sun, J., Fuxa, J. and Henderson, G. 2002. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Captotermes formosanus* *in vitro*. *Journal of Invertebrate Pathology* 81(2):78-85.
- Tamerler-Yildir, C. Adlard, M. W. and Keshavarz, T. 1997. Production of swainsonine from *Metarhizium anisopliae* stirred-tank and air-lift reactors. *Biotechnology letters* 19(9):919-922.
- Tian, X. L., Yao, Y. R., Chen, G. H., Mao, Z. C., Wang, X. T. and Xie, B. Y. 2014. Suppression of *Meloidogyne incognita* by the endophytic fungus *Acremonium implicatum* from tomato root galls. *International Journal of Pest Management* 60(4):239-245.
- Toledo, R. L. C., Sosa-Moss, C. and Zavaleta-Mejía, E. 1993. Gama de hospederos de cinco poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 23(1):105-108.
- Vanstone, V., Hollaway, G. and Stirling, G. 2008. Managing nematode pests in the southern and western regions of the Australian cereal industry: continuing progress in a challenging environment. *Australasian Plant Pathology* 37(3): 220-234.
- Valle, R. V. 2001. Nematodos agalladores afectando hortalizas y otros cultivos en el norte centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(1):107-109.
- Vásquez V. A. M. 2013. Producción de xilanasas por *Aspergillus* sp.: en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. Tesis. Universidad Iberoamericana, México D.F. 81p.
- Velásquez-Valle, R., Amador-Ramírez, M. D., Medina-Aguilar, M. M y Lara-Victoriano, F. 2006. Presencia de patógenos en almácigos y semilla de chile (*Capsicum annuum* L) en Aguascalientes y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1):75-79.
- Vilchis-Martinez, K., Manzanilla-López, R. H., Powers, S. J. and Belmont, R. M. 2014. Effect of the addition of crude plant extracts on the parasitism of

- Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* on *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 43(2):254-260.
- Villa-Briones, A., Zavaleta-Mejía, E., Vargas-Hernández, M., Gómez-Rodríguez, O. y Ramírez-Alarcón, S. 2008. Incorporación de vermicomposta para el manejo de *Nacobbus aberrans* en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Chapingo. Serie horticultura* 14(3): 249-255.
- Yamazaki, M., Okuyama, E., Kobayashi, M., and Inoue, H. 1981. The structure of paraherquamide a toxic metabolite from *Penicillium paraherquei*. *Tetrahedron Letters* 22:135-136.
- You, N., Liu, W., Wang, T., Ji, R., Wang, X., Gong, Z. and Tao, K. 2012. Swainsonine inhibits growth and potentiates the cytotoxic effect of paclitaxel in hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Oncology Reports* 28(6): 2091-2100.
- Zamudio, G. V. 1987. Evaluación de la resistencia de colecciones y variedades comerciales de tomate (*Lycopersicon* spp.) a *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 88p.
- Zhao, M., Gao, X., Wang, J., He, X., and Hand, B. 2013. A review of the most economically important poisonous plants to the livestock industry on temperate grasslands of China. *Journal of Applied Toxicology* 33:9-17.
- Wang, B., Kang, Q., Lu, Y., Bai, L. and Wang, C. 2012. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(4):1287-1292.
- Wu, C., Wang, W. L., Ma, F., Cao, D., Yang, X., Wang, S. and Zhao, B. 2014. Pathogenesis and preventive treatment for animal disease due to locoweed poisoning. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37:336-347.
- Xu, Y., Orozco, R., Wijeratne, E. K., Gunatilaka, A. L., Stock, S. P., and Molnár, I. 2008. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chemistry & Biology* 15(9):898-907.

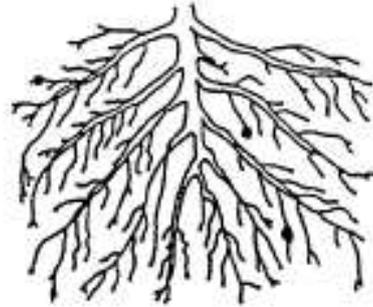
ANEXO

Diagrama de índice de agallas para nematodo agallador

Tomado de Coyne *et al*, 2007.



0 – No se observan nódulos en las raíces.



1 – Pocas agallas pequeñas, difíciles de encontrar.



2 – Solo agallas pequeñas pero claramente visibles. Las raíces principales limpias.



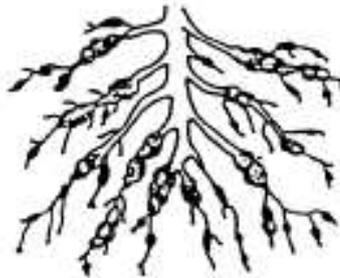
3 – Algunas agallas visibles y grandes.



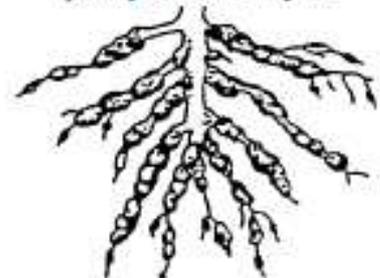
4 – Predomina las agallas grandes pero las raíces principales están limpias.



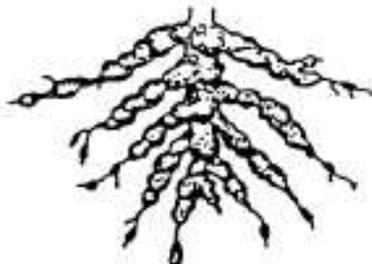
5 – 50% de las raíces afectadas. Agallado de algunas de las raíces principales. Sistema radical reducido.



6 – Agallado en las raíces principales.



7 – La mayoría de las raíces principales agalladas.



VELOCIDAD DE CRECIMIENTO RADIAL DE *Metarhizium anisopliae* EN MEDIO HARINA DE AVENA

López SMY¹, Barranco FE², Ruiz JD¹, Flores MA¹, Gutiérrez RM¹

¹Departamento de Producción Agrícola y Animal. ²Departamento Sistemas Biológicos Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Xochimilco, Ciudad de México.

✉ monica.yaz.lopez@gmail.com ✉ druizjuarez@yahoo.com.mx

I. INTRODUCCIÓN

Metarhizium anisopliae es un entomopatógeno alternativo a los insecticidas químicos, se usa en los programas de control biológico de insectos plaga ⁽¹⁾. En la actualidad, diferentes cepas de *Metarhizium* son reportadas como productoras de *Swainsonina* que tienen un efecto tóxico para la estructura celular ⁽¹⁾. *Swainsonina* es un alcaloide indolizidina que inactiva la alfa-manosidasa quien altera el procesamiento de la glicoproteína ⁽²⁾. De acuerdo a Patrick et al. ⁽³⁾ la producción de *Swainsonina* es por medio de la fermentación líquida en Harina de Avena durante el desarrollo de *M. anisopliae*. Sin embargo, para evaluar la virulencia de los hongos entomopatógenos es necesario medir la velocidad del crecimiento radial del hongo en medio sólido.

II. OBJETIVO

Evaluar la velocidad del crecimiento radial de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* en medio Harina de Avena.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron tres cepas de *M. anisopliae* UAM-Xoch (Laboratorio de Biotecnología de UAM-X), *Tac-1* y *Xoch-8* (Departamento de Biotecnología de UAM-I). Cada cepa se sembró por triplicado. A partir de cultivos monospóricos de cada cepa se preparó una solución a una concentración de 3.1×10^6 conidios por mL, se tomaron alícuotas $7.5 \mu\text{l}$, se colocaron en el centro de cajas de Petri con medio Harina de Avena al 6%, glucosa 2% y agar 2% y se incubaron a 28°C. La velocidad del crecimiento radial del hongo se midió a partir de la aparición de las colonias ⁽⁴⁾. El crecimiento radial de *M. anisopliae* se midió con un vernier en intervalos de 24 horas, durante 9 días ^(Fig.1). El análisis de medias se comparó con una prueba Tukey ($p=0.05$).

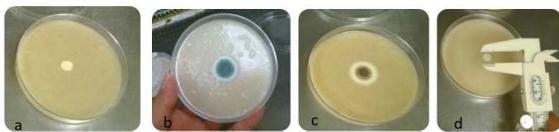


Fig. 1 Crecimiento cepas de *Metarhizium anisopliae* en medio Harina de Avena. a) Cepa *Tac-1*, b) Cepa *UAM-Xoch*, c) Cepa *Xoch-8* y d) Medición de crecimiento.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La velocidad del crecimiento y desarrollo radial de las cepas de *Metarhizium anisopliae* en el tiempo en medio Harina de Avena presentó una tendencia lineal ^(Figura 2). Por otro lado la velocidad de crecimiento y desarrollo entre las tres cepas de *M. anisopliae* en medio Harina de Avena no mostró diferencia significativa ^(Cuadro 1).

V. CONCLUSIONES

Las tres cepas de *Metarhizium anisopliae* no presentan dificultad para crecer y desarrollar en medio de Harina de Avena. En la prueba de velocidad de crecimiento radial no se encontraron diferencias significativas entre cepas. La cepa *UAM-Xoch* mostró una tendencia de mayor crecimiento y desarrollo en igualdad de condiciones, respecto con los demás aislados, sin embargo sus características macroscópicas son diferentes.

VI. BIBLIOGRAFÍA

¹Roberts, D. y Leger, R. 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol*, 54:1-70. ²Cook, D., Beaulieu, W.T., Mott, I.W., Riet-Correa, F. Gardner, D.R., Grum, D. and Marcolongo-Pereira, C. 2013. Production of the alkaloid swainsonine by a fungal endosymbiont of the Ascomycete order Chaetothyriales in the host *Ipomea carnea*. *J Agr food Chem*, 61(16):3797-3803. ³Patrick, M., Adlard, W., y Keshavarz, T. 1993. Production of an indolizidine alkaloid, swainsonine by the filamentous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol Lett*, 15(10):997-1000. ⁴Gibson, A.M., Hocking, A. D. 1997. Advances in the predictive modeling of fungal growth in food. *Trends Food Sci Tech*, 8:353-358. ⁵Cruz-Avalos, M., Cruz-Vázquez, C., Lezama-Gutiérrez, R., Vitela-Mendoza, I. y Angel-Sahagún, C. 2015. Selection of isolates of entomopathogenic fungus for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Trop Subtrop Agroecosyst*, 18:175-180.

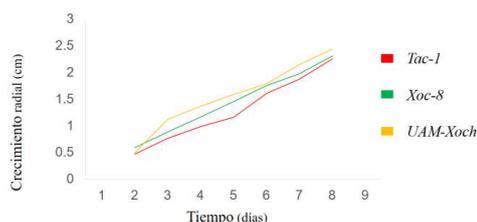


Fig. 2 Crecimiento radial acumulativo de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* en medio Harina de Avena.

Sin embargo la cepa *Xoch-8* mostró una diferencia de 0.04 cm/día. Estos resultados coinciden con la velocidad de crecimiento de cuatro aislados de *M. anisopliae* observados por Cruz-Avalos et al. ⁽⁵⁾ al evaluar la velocidad del crecimiento radial con rangos que van de 0.130 a 0.360 cm/día.

Cuadro 1. Velocidad de crecimiento radial de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* en caja Petri con medio de cultivo Harina de Avena

Cepa	Tiempo de esporulación	Color de esporulación	Velocidad de crecimiento radial (cm/día)*
<i>Tac-1</i>	Seis días	Verde- amarillo	0.242+0.057 ^a
<i>Xoch-8</i>	Cuatro días	Verde- azul	0.206+0.010 ^a
<i>UAM-Xoch</i>	Un día	Verde-amarillo	0.249+0.045 ^a

*Valores con diferente letra dentro de la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Así mismo cada cepa mostró características diferentes en color de conidios y tiempo de esporulación ^(Cuadro 1). Las tres cepas presentaron un patrón de formación de anillos. Conforme el crecimiento y desarrollo de las cepas, por el envés de las placas se observó un cambio de color. En la *Xoch-8* se notó una coloración amarilla, en *Tac-1* amarillo con centro café y *UAM-Xoch* de color verde-azul.