

Infección *in vitro* de cepas de *Beauveria* spp. sobre *Globodera rostochiensis* Wollenweber (1923)

In vitro infection of *Beauveria* spp. on *Globodera rostochiensis* Wollenweber (1923)

Recibido: 7 de diciembre del 2016
Aceptado: 20 de marzo del 2018
Publicado: 18 de septiembre del 2018

Melchor Cepeda-Siller*, Fabiola Garrido Cruz*, Efraín Castro Narro*, Sergio Rene Sánchez Peña*, Miriam Desiré Dávila Medina**

Cómo citar:

Cepeda-Siller, M., Garrido Cruz, F., Castro Narro, E., Sánchez Peña, S. R., & Dávila Medina, M. D. (2018). Infección *in vitro* de cepas de *Beauveria* spp. sobre *Globodera rostochiensis* Wollenweber (1923). *Acta Universitaria*, 28(4), 25-30. doi: <http://doi.org/10.15174/au.2018.1714>

* Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro No. 1923, Buenavista. Saltillo, Coahuila, de Zaragoza, México. C.P. 25315. Tel: 844 4 11 03 26. Correo electrónico: fabygarrido@hotmail.com.

** Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila.

° Autor de correspondencia.

Palabras Clave:

Beauveria spp.; *Globodera rostochiensis*; control biológico; Nematodo dorado de la papa.

Keywords:

Beauveria spp.; *Globodera rostochiensis*; biological control; Golden cyst nematode.

RESUMEN

El nematodo dorado *Globodera rostochiensis* es uno de los principales problemas en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), sus quistes pueden permanecer viables en el suelo hasta por treinta años. Para su control se utilizan nematicidas químicos, sin embargo, los bioplaguicidas son una alternativa eficaz en el control de plagas agrícolas. Se aislaron y evaluaron cuatro cepas del hongo *Beauveria* spp. a concentraciones de 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 sobre quistes de *G. rostochiensis*. La infección se registró a las 72 h con todas las concentraciones, de todas las cepas, sin embargo, la RH4 fue la única que infectó al nematodo en el estadio de huevo en todas las concentraciones. A las 96 horas se observó infección en las diferentes cepas, excepto la U9 que infectó hasta las 120 h. Comprobando con esto que *Beauveria* spp. puede ser utilizado para el control de *G. rostochiensis*.

ABSTRACT

The golden nematode *Globodera rostochiensis* is one of the main problems in the potato crop (*Solanum tuberosum* L.); its cysts can remain viable in the soil for up to 30 years. Chemical nematicides are used for its control; however, biopesticides are an effective alternative in the control of agricultural pests. Four strains of the fungus *Beauveria* spp. were isolated and evaluated at concentrations of 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 on cysts of *G. rostochiensis*. 72 h since the process began, the infection was observed on the cysts in all dilutions and all strains, but RH4 strain was the only one that infected the nematode in the egg stage at all concentrations. After 96 hours, infection was observed in the different strains on the juveniles, except the U9 that presented infection after 120 h. This proves that *Beauveria* spp. can be used for the control of *G. rostochiensis*.

INTRODUCCIÓN

El nematodo dorado *Globodera rostochiensis* es uno de los principales problemas en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). En el mundo, se encuentra distribuido en 75 países (Sullivan, Insera, Franco, Moreno & Greco, 2007; Yu, Ye, Sun & Miller, 2010). En 1971 fue detectado por primera vez en México en el estado de Guanajuato donde se dictaminó la Cuarentena Interna No. 17. Hasta el año 2009 de manera oficial se encuentra distribuido en nueve estados de la República (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [Senasica], 2013).

La infección de este nematodo puede disminuir el rendimiento del cultivo de papa hasta en un 80% (Singh, Hodda & Ash, 2013), ya que al invadir las raíces causa daños irreversibles reduciendo su capacidad de absorción de agua y minerales por lo que las plantas infestadas con este patógeno envejecen de manera prematura además de presentar bajos rendimientos y síntomas causados por deficiencias de nutrientes (Whitehead, 1998).

Su ciclo de vida es de 45 días aproximadamente, la fase infectiva es el segundo estadio juvenil (J2), el cual al salir del huevo y encontrar al hospedante penetra la raíz por la parte del área de crecimiento. Los machos en el cuarto estadio son vermiformes, mientras que las hembras al incrementar su tamaño rompen la superficie de la raíz y exponen sus cuerpos esféricos manteniendo su cabeza, dentro del tejido y por la atracción a los machos ocurre la reproducción sexual y la fase de la producción de huevos, cada quiste contiene de 200 huevos a 500 huevos (Brodie, Evans & Franco, 1993). Estos quistes pueden permanecer viables en el suelo por 30 años en un estado de dormancia, dependiendo de las condiciones ambientales o por factores endógenos (González & Phillips, 1996).

El manejo de este nematodo ha sido eficiente con el carbamato de nombre común Oxamil, nematicida no fumigante registrado y autorizado en papa (Centre for Agriculture and Biosciences International, 2011). Sin embargo, el exceso en el uso de plaguicidas ha demostrado efectos de naturaleza tóxica, cancerígena, teratogénica, capacidad de bioacumulación y persistencia en el medio ambiente (Damalas & Eleftherohorinos, 2011). Se ha determinado la presencia de residuos de plaguicidas en la cáscara e interior de la papa, pudiendo repercutir negativamente en la salud del consumidor (Benítez, Miranda, Molina, Sánchez & Balza, 2015).

Los bioplaguicidas son una alternativa eficaz en el control de plagas agrícolas, actualmente la investigación se enfoca en disminuir la contaminación ambiental causada por residuos de plaguicidas químicos (Leng, Zhang, Pan & Zhao, 2011).

Existen hongos patógenos de insectos con un amplio rango de hospederos, entre ellos, *Beauveria* spp. (Alatorre, 2007), el cual es ampliamente utilizado como controlador biológico. Su mecanismo consiste en la acción enzimática, principalmente de proteasas, lipasas y quitinasas, afectando el tejido en el área de penetración y causando el rompimiento de la pared celular y, por tanto, la muerte del insecto (Monzón, 2001).

Lora & Betancourth (2010) registraron el efecto positivo de control de nematodos con el hongo *Beauveria bassiana*, en condiciones de laboratorio e invernadero. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la infección de quistes, huevos y juveniles del nematodo dorado de la papa con *Beauveria* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción e identificación de quistes

Se utilizó una muestra de suelo de papa (*Solanum tuberosum*) proveniente del ejido Navidad, municipio de Galeana, Nuevo León, a la cual se le realizó la extracción de quistes de *Globodera* spp. por la metodología del embudo de Fenwick (1940), donde el sobrenadante retenido por el tamiz se secó con papel absorbente y posteriormente bajo el microscopio estereoscópico, los quistes fueron separados e identificados morfológicamente por las medidas morfométricas del patrón fenestral en el microscopio compuesto (Baldwin & Mundo-Ocampo, 1991).

Obtención e identificación de hongos entomopatógenos (*Beauveria* spp.)

Durante los meses de octubre a enero, se realizaron muestreos de suelos en los siguientes sitios:

1. Ejido Higo, Ramos Arizpe, Coahuila.
2. Cañón de la Carbonera, Arteaga, Coahuila.
3. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila.

Se colectaron 5 muestras de suelo en cada uno de los sitios mencionados a una profundidad de 15 cm a 30 cm, mismas que fueron colocadas en bolsas de plástico negras previamente etiquetadas y rotuladas, posteriormente se trasladaron al laboratorio para llevar a cabo el aislamiento de entomopatógenos para lo cual se utilizó la técnica del insecto cebo descrita por Zimmermann (1986). Las muestras de suelo se repartieron en recipientes de 500 ml, se les agregó humedad y se liberaron dos larvas de *Tenebrio molitor* (insecto cebo) en cada una. Estas fueron

revisadas a los 7 días y 14 días y las larvas muertas se separaron y se desinfectaron con hipoclorito de sodio, posteriormente se colocaron en cámara húmeda para darle las condiciones a los hongos entomopatógenos. Una vez observado el crecimiento micelial, el aislamiento se llevó a cabo mediante la metodología de Goettel & Inglis (1997). Los aislamientos utilizados se propagaron en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la esporulación del hongo. Las cepas aisladas fueron identificadas por medio de sus estructuras, observadas bajo el microscopio compuesto utilizando las claves de Barnett & Hunter (1998).

Infección de quistes de *Globodera rostochiensis* con el hongo *Beauveria* spp.

Se seleccionaron cuatro diferentes cepas de *Beauveria* spp. con base en la rapidez en su crecimiento y esporulación para posteriormente reactivarlas en PDA e incubarlas durante un lapso de siete días a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se realizó un lavado de esporas, mismo que fue utilizado para preparar diluciones contando el número de conidias con la cámara de Neubauer y ajustadas a concentraciones de 1×10^4 conidias/mL, 1×10^5 conidias/mL, 1×10^6 conidias/mL. Para el bioensayo se utilizaron quistes desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio en una concentración al 2% durante 30 s, enjuagándolos tres veces con agua destilada estéril y se secaron sobre un papel secante estéril.

Se colocaron cuatro quistes en cajas Petri con medidas de 60 mm \times 15 mm, con agar agua y se adicionaron 500 μL de las diferentes diluciones por separado, distribuidos por toda la caja y sobre ellos. Se realizaron cuatro repeticiones por dilución y un testigo con agua destilada estéril.

Las cajas se mantuvieron en el laboratorio, a temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, observando los quistes cada 24 h bajo el microscopio estereoscópico, abriéndolos con un bisturí con el fin de observar la infección del hongo sobre los huevecillos y juveniles de *G. rostochiensis*.

A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza (Anova) y prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia de 0.01.

RESULTADOS

Identificación del nematodo

Los quistes aislados del suelo se observaron de forma esférica, algunos con coloración de amarillo a dorado y otros de color café. Para la identificación de especie se realizó la observación del patrón fenestral contando un número de 17 estrías cuticulares, entrecruzadas entre el ano y la vulva,

que presentó un diámetro de $17.29\text{ }\mu\text{m}$ y se localizó a una distancia de $59.28\text{ }\mu\text{m}$ del ano, con un radio de Granek de $3.42\text{ }\mu\text{m}$ (figuras 1 y 2). Al ser este nematodo una plaga cuarentenaria, se realizaron análisis moleculares para su identificación en un laboratorio de referencia, donde se corroboró la especie como *G. rostochiensis*.

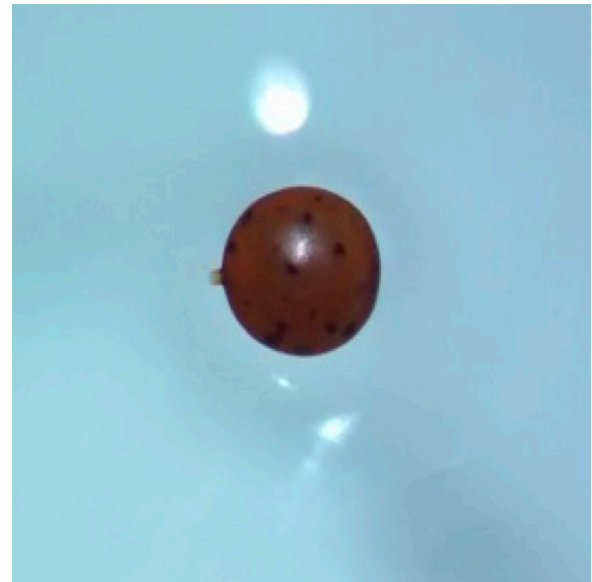


Figura 1

Quiste sano de *G. rostochiensis*.
Fuente: Elaboración propia.



Figura 2

Patrón fenestral de *Globodera rostochiensis*.
Fuente: Elaboración propia.

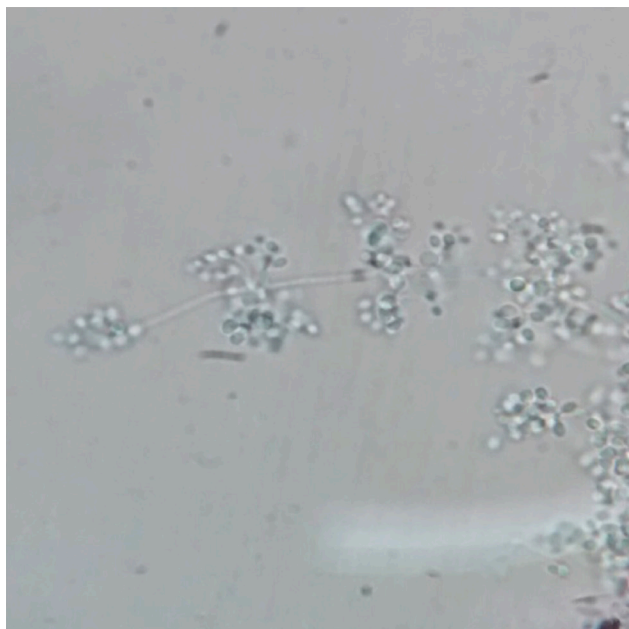


Figura 3

Hifas, filiales y esporas de *Beauveria* spp.
Fuente: Elaboración propia.



Figura 4

Quiste de *G. rostochiensis* parasitado *in vitro* a las 72 h con *Beauveria* spp.
Fuente: Elaboración propia.

Tabla 1 Localidades de muestreo y claves de las cepas de *Beauveria* spp. aisladas

Localidad de muestra	Clave
Ejido Higo, Ramos Arizpe Coahuila.	RH1
	RH4
Cañón de la Carbonera, Arteaga, Coahuila.	BSA3
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.	U9

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2 Infección de quistes de *Globodera rostochiensis* con *Beauveria* spp. y comparación de resultados obtenidos a las 48 h después de la inoculación

Cepa	Dilución	24 h	48 h	Media	72 h
RH1	1 x 10 ⁴	0%	50.00%	BCD	100%
	1 x 10 ⁵	0%	56.25%	BCD	100%
	1 x 10 ⁶	0%	68.75%	ABC	100%
RH4	1 x 10 ⁴	0%	68.75%	ABC	100%
	1 x 10 ⁵	0%	75.00%	AB	100%
	1 x 10 ⁶	0%	87.50%	A	100%
BSA	1 x 10 ⁴	0%	31.25%	DE	100%
	1 x 10 ⁵	0%	37.50%	DE	100%
	1 x 10 ⁶	0%	43.75%	CDE	100%
U9	1 x 10 ⁴	0%	18.75%	E	100%
	1 x 10 ⁵	0%	37.50%	DE	100%
	1 x 10 ⁶	0%	43.75%	CDE	100%

Fuente: Elaboración propia.

Aislamiento de hongos

De los aislamientos realizados a partir de las muestras de suelo, se obtuvieron un total de 4 cepas. Mediante observación de sus estructuras se les identificó como pertenecientes al género *Beauveria*, que se caracteriza por presentar un crecimiento lanoso de color blanco y con abundantes conidias.

En el microscopio compuesto, se observaron hifas cenocíticas con filiales en forma de racimo, irregularmente agrupados, en forma de botella, sosteniendo a las esporas en forma de zig-zag. Las conidias son hialinas, lisas de forma globosa a elipsoidal, como lo descrito por las claves de Barnett & Hunter (1998) (tabla 1, figura 3).

Infección de quistes de *Globodera rostochiensis* con *Beauveria* spp.

A las 48 h después de la aplicación, la cepa RH4 presentó mayor número de quistes infectados. La comparación de medias solo se le realizó en este tiempo, ya que fue donde se obtuvo diferencias estadísticamente significativas. A las 72 h se observó el efecto del hongo sobre los quistes en todas las cepas y todas las diluciones, (tabla 2; figura 4), en huevos solo se presentaron infecciones aisladas, en

concentraciones de 1×10^6 de cada cepa, excepto la RH4 que infectó en todas las concentraciones en este lapso de tiempo. Siendo hasta las 96 h en donde se presentan infecciones mayores en huevos, en todas las concentraciones para cada cepa (figura 5). Para el caso de los juveniles se observaron efectos hasta las 96 h de evaluación en algunos huevos eclosionados (figura 6), a excepción de la cepa U9, que la infección en juveniles se presentó hasta las 120 h. La cepa que mostró los mejores resultados fue la RH4.

DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos se comprueba que el suelo es un importante reservorio de microorganismos, los cuales pueden ser utilizados para el control de plagas, coincidiendo con lo descrito por Sun & Liu (2008) donde se ha señalado al género *Beauveria*, entre los hongos entomopatógenos más comunes. Biswas, Dey, Satpathy, Satya & Mahapatra (2013) lo califican como el hongo de suelo más utilizado contra insectos plaga, y con este experimento se demuestra que parasita en condiciones *in vitro*, a distintos estadios del nematodo *G. rostochiensis*. Por lo tanto, al observar este parasitismo sobre los huevos de *G. rostochiensis*, se puede asumir que afecta en el ciclo de vida de esta plaga, como lo observó Trifonova (2010), quien evaluó otros hongos como *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. sobre *G. rostochiensis* bajo condiciones de invernadero, donde demostraron la inhibición en la reproducción del nematodo.

La concentración de 1×10^6 fue la que mostró los mejores niveles de parasitismo sobre los quistes, huevos y juveniles del nematodo, esto fue similar a lo reportado por Salazar, Betancourth & Castillo (2012) quienes evaluaron el hongo *Beauveria bassiana* a diferentes concentraciones, así como otros hongos, sobre el nematodo *Meloidogyne* spp. en invernadero, donde el mejor resultado para este hongo fue utilizando la concentración de 1×10^6 esporas.

En otros experimentos, como el mencionado por Franco, Gonzales & Matos (1993) realizados bajo condiciones de invernadero, se ha demostrado que cepas de *Beauveria bassiana* tienen efecto nematocida eficiente contra *G. pallida*. Esto concuerda con lo reportado en esta investigación, ya que en la disección de quistes parasitados, se pudieron observar hifas del hongo al interior de los huevos afectados.

CONCLUSIONES

El suelo es un importante reservorio de hongos que pueden ser utilizados para control de plagas. *Beauveria* spp. se encuentra presente en muestras de suelo de tres diferentes regiones del estado de Coahuila y a las 72 h de la

inoculación *in vitro* se observó su parasitismo sobre los quistes, huevos y juveniles del nematodo dorado de la papa *G. rostochiensis*. Con esto se comprueba que pueden ser utilizados como herramientas eficaces para el control biológico de fitopatógenos, con un estudio más detallado *in vivo*, así como su mecanismo de acción y producción de metabolitos.



Figura 5

Huevo de *G. rostochiensis* parasitado con *Beauveria* sp.
Fuente: Elaboración propia.



Figura 6

Huevo eclosionado de *G. rostochiensis* parasitado con *Beauveria* sp.
Fuente: Elaboración propia.

REFERENCIAS

- Alatorre, R. R. (2007). Hongos entomopatógenos. En: L. A. Rodríguez del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (eds.). *Teoría y Aplicación del Control Biológico* (pp. 127-143). México: Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- Baldwin, J. G., & Mundo-Ocampo, M. (1991). Heteroderinae, cyst and non-cyst-forming nematodes. En: W. R. Nickle, (ed.). *Manual of agricultural nematology*. (pp. 275-362). New York: Marcel Dekker.
- Barnett, H. L., & Hunter B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th Edition. Richmond, TX: The American Phytopathological Society Press.
- Benítez, P., Miranda, L., Molina, Y., Sánchez, B., & Balza, A. (2015). Residuos de plaguicidas en la cáscara e interior de la papa (*Solanum tuberosum* L.) proveniente de una región agrícola del estado Mérida, Venezuela. *Bioagro*, 27(1), 27-36.
- Biswas, C., Dey, P., Satpathy, S., Satya, P., & Mahapatra, B. (2013). Endophytic colonization of white jute (*Corchorus capsularis*) plants by different *Beauveria bassiana* strains for managing stem weevil (*Apion corchori*). *Phytoparasitica*, 41(1), 17-21.
- Brodie, B. B., Evans, K., & Franco, J. (1993). Nematode parasites of potatoes. En: K. Evans, D. Trudgill, & J. Webster. (Eds.) *Plant parasitic nematodes in Temperate Agriculture*. (pp.87-132). UK: CAB International.
- Centre for Agriculture and Biosciences International. (2011). *Crop Protection Compendium*. Global Module 7nd 44. Edition. Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19942300048>
- Damalas, C., & Eleftherohorinos, I. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5): 1402-1419.
- Fenwick, D. W. (1940). Methods for the recovery and counting of cyst of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology*, 18(4), 155-172.
- Franco, J., Gonzales, A., & Matos, A. (1993). *Manejo integrado del nemátodo quiste de la papa*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- González, J., & Phillips, M. (1996). Hatching behaviour of potato cyst nematodes from the Canary Islands. *The Journal of Nematology*, 28(4), 451-456.
- Goettel, M. S., & Inglis, G. D. (1997). Fungi: Hyphomycetes, En L.A. Lacey. (ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. (pp. 213-249) Nueva York: Academic Press.
- Leng, P., Zhang, Z., Pan, G., & Zhao, M. (2011). Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology*, 10(86), 19864-19873.
- Lora, D. M., & Betancourt G. C. (2010). Evaluación de los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus* en el control de *Meloidogyne* spp. en lulo *Solanum quitoense* y tomate de árbol *Solanum betacea*. *Fitosanidad*, 14(1), 59.
- Monzón A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*, 63, 95-103.
- Salazar, C., Betancourth, C., & Castillo, A. (2012). Efecto de controladores biológicos sobre el nematodo *Meloidogyne* spp. en lulo (*Solanum quitoense* Lam). *Revista de Ciencias Agrícolas*, 29(2), 81-92.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (Senasica) (2013). Ficha Técnica No. 19 *Nematodo dorado Globodera rostochiensis*. Dirección General de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.
- Singh, S. K., Hodda, M., & Ash, G. J. (2013). Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. *EPPO Bull.*, 43(2), 334-374.
- Sullivan, M. J., Inseerra, R. N., Franco, J., Moreno Leheudé, I., & Greco, N. (2007). Nematodos quiste de la papa: sus hospedantes e impacto regulatorio. *Nematropica*, 37(2), 193-202.
- Sun, B. D., & Liu, X. Z. (2008). Occurrence and Diversity of Insect-associated Fungi in Natural Soils in China. *Applied Soil Ecology*, 39(1), 100-108.
- Trifonova, Z. T. (2010). Studies on the efficacy of some bacteria and fungi for control of *Globodera restochiensis*. *Journal of Agricultural Sciences*, 55(1), 37-44.
- Whitehead, A. G. (1998). *Plant Nematode Control*. Oxon, UK: CAB International.
- Yu, Q., Ye, W., Sun, F., & Miller, S. (2010). Characterization of *Globodera rostochiensis* (Tylenchida: Heteroderidae) associated with potato in Quebec, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32(2), 264-271.
- Zimmermann, G. (1986). The "Galleria bait method" for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102(1-5), 213-215.